

THESE

Présentée à l'U.F.R. des Sciences Exactes et Naturelles

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne
Spécialité : Biotechnologie

Par

David DONNEZ

Sujet :

**Etude de la bioproduction des stilbènes dans les
suspensions cellulaires de *Vitis* 41B : élicitation et
mécanismes de l'induction de la biosynthèse**

Soutenue publiquement le 17 décembre 2010, devant le jury composé de :

Mme ADRIAN M., Professeur, Université de Bourgogne
M. MERILLON J.-M., Professeur, Université de Bordeaux
M. De LUCA V., Professeur, Brock University, Canada
M. JEANDET P., Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne
M. CLEMENT C., Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne
M. COUROT E., Docteur, Université de Reims Champagne-Ardenne

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur
Co-directeur



Remerciements



Tout d'abord, je souhaiterais remercier les professeurs Marielle Adrian et Jean-Michel Mérillon pour avoir acceptés d'être rapporteur de ce travail. Je remercie également les professeurs Philippe Jeandet et Vincenzo de Luca d'endosser le rôle d'examineur.

Je remercie le Professeur Christophe Clément de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de m'encadrer. Je souhaiterais souligner la liberté qu'il a laissé, à Eric et à moi, dans la conduction des travaux réalisés durant mon doctorat.

Je souhaiterais remercier le Docteur Eric Courot tant pour, après réflexion, m'avoir choisi comme stagiaire de Maîtrise, que pour le chemin que nous avons parcouru ensemble depuis. Eric m'a appris de nombreuses techniques, en *in vitro* notamment, mais il m'a surtout transmis sa passion et sa façon de vivre la recherche. Je crois que pour comprendre cette passion, il suffit de voir son émotion lors de la révélation d'un nouveau résultat. Il s'est toujours battu pour trouver des financements et un partenaire pour la bioproduction, sans jamais oublier de m'inclure dans cette démarche. Je lui suis très reconnaissant et je l'apprécie tant pour ses qualités humaines que scientifiques.

Je tiens à présenter mes remerciements au Professeur Fabienne Baillieul pour ses conseils et son implication dans la correction de mon introduction.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Sandrine (la Souricette) avec sa bonne humeur et son entrain, Barbara avec sa sympathie, Blandine avec son détachement, Stéphanie avec sa timidité, Carole avec son optimisme, Urska avec son dynamisme et sa motivation, Chiara et Pierre avec leur sérieux et leur humour.

Je remercie tous les collègues du SRDP pour avoir rendu mon expérience de travail au sein de ce laboratoire très agréable. Je ne voudrais pas oublier l'ambiance unique des repas de Noël et de juillet, des pots de soutenances de thèse et d'HDR, ainsi que celle de la période des traditionnelles galettes des rois s'étalant souvent sur plus d'un mois.

Je voudrais tout particulièrement remercier les personnes avec lesquelles j'ai partagé le même bureau. Chacun d'entre eux a apporté et partagé une partie de ses humeurs bonnes ou mauvaises, de son stress et de ses réussites et ont fait de ce lieu une interface non seulement de travail mais aussi de communication et d'entraide. Chacun a contribué comme Cédric avec ses chansons, Stéphane et les surnoms qu'il donnait à tout le monde ainsi que mes « blablabla » qui tantôt l'insupportait et d'autre fois le faisait rire, Nono et Dali toujours ensemble avec leurs « youhou », Andréas avec sa gentillesse et nos discussions lors de pause café, Sophie qui après le départ de Nono et Dali est restée la seule fille dans ce bureau de brute comme la voix de la « raison », Bertrand avec son charisme inédit capable d'hurler le pire vocabulaire familial qui soit avec son accent du Nord et après d'épiloguer avec passion



sur les plantes carnivores et les champignons ou encore Olivier avec sa culture et ses idées politiques mais se laissant parfois aller aux frontières de la trivialité. A ces personnes se mêlent Sophie 2 qui est le pilier du groupe de premier étage composé de Steven, Clémentine, Mathilde et Gaëlle. Je pense aussi à tous ceux qui sont restés plus ou moins longtemps ou qui sont encore là en doctorat, post-doctorat, stage ou contrat : Sandra, Anne-lise, Sébastien, Alessandro, Giani, Parull, Maryline, Gaëlle, Camille, Sabrina, Anouk, Souad, Patricia, Hélène, Delphine, ...

Je voudrais remercier Cathy pour nos nombreuses discussions en préparant du milieu de culture et aussi pour nos vidanges de l'autoclave... Ainsi que Barbara qui a repris son poste et sa place d'interlocutrice.

J'aimerais remercier le professeur Philippe Jeandet pour m'avoir toujours ouvert les portes de son laboratoire pour les analyses HPLC et autres, ainsi que pour ses discussions sur le resvératrol et bien d'autres sujets. Je remercie le personnel du laboratoire d'œnologie de m'avoir réservé un excellent accueil et en particulier Alexandra pour le temps qu'elle a consacré à mes analyses.

Je remercie le professeur Pierre Jeannesson pour m'avoir accueilli avec son doctorant Nicolas pour réaliser les premières images en vidéomicroscopie de mes cellules. Ainsi que Christine Terryn qui a su exploiter au mieux ses microscopes pour obtenir les images des cellules de 41B. Je la remercie également pour ses bons moments à discuter durant les longues minutes d'acquisition des images.

Je remercie le professeur Abdel Belarbi de m'avoir permis d'utiliser son bioréacteur.

Je remercie tous les joueurs de foot débutants ou confirmés qui sont venus partager quelques heures de sport et de détente lors de nos hebdomadaires parties. J'en profite ainsi pour citer les plus fidèles : Cédric (encore), Jean-Louis, Johnny, Hervé, Sébastien, Yannick, Thomas, Andrei, Bertrand (lui aussi), Thibault et les nouveaux : les filles du labo et Steven.

I want to thanks the professor Vincenzo de Luca for his welcome to Ontario and to have allowed realizing this project. Vincenzo is very close of the lab people and have always good advice. I called often him during the redaction of the manuscript and he always motivated me to finish. I am grateful to him and to his wife, Liliane. I want to thanks the people of the lab for their welcome and to permit me to spend a wonderful time in Canada: Kim, Ashok, Vonny, Antje, Vigi, Ashu, Dillan, Fang, and particularly Maggy and Jon. I want thank the international office of Brock University for their services and in particular: Cassidy, Sheila, and Liv. I think to all the people who played ball hockey and soccer, visited the Niagara region, or simply spent some time with me: Matthieu, Florian, Nicolas, Pauline, Jonathan,



Marc, Dario, Bruno, Fang-Fang, Do, Die Quin, Zhendy, Brian, Jackie, Tony, ...

Je remercie mes amis d'être toujours là dans les bons moments mais aussi dans les plus difficiles. Les moments passés ensembles contribuent à mon équilibre et me permettent d'avancer et d'être optimiste. Je voudrais remercier Stéphane pour avoir toujours été là depuis la deuxième année de fac, pour tous les moments partagés et sa disponibilité. Je souhaite remercier particulièrement Fred qui nous a accueilli tant de fois chez lui quand il habitait à Reims et qui maintenant vient me rendre visite régulièrement. Je voudrais pouvoir remercier individuellement chacun de mes amis mais je ne vais pas écrire 100 pages de remerciement. Ce sera donc un remerciement collectif, désolé, donc merci à : Bérangère et Bruno, Sylvia et Jérôme, Claire et Alex, Vanessa et Florian, Stéphanie et David, Mikael, Laetitia, Barbara. Je souhaiterais avoir une petite pensée pour ceux qui se sont éloignés petit à petit et dont je n'ai plus souvent de nouvelle comme Cendrine, Thibault, Clotilde, Anne-Laure et surtout Julien.

Je remercie ma famille d'avoir toujours été là que ce soit mes oncles et mes tantes mais aussi mes cousins. Un grand merci à mes grands-parents, Paulette et Charles pour leur soutien et les goûters du week-end toujours aussi agréable, ainsi qu'à ma grand-mère Marcelle qui a toujours autant plaisir à me parler au téléphone et à me voir. Je voudrais aussi avoir une pensée pour mon grand-père Gilbert qui nous a quittés trop tôt mais qui a toujours tenu à ma réussite.

Je tiens à remercier mes parents pour l'éducation et les valeurs qu'ils ont su me transmettre. Même s'ils se sont séparés, ils m'ont toujours soutenu à leur manière et ont contribué à ma réussite tant au niveau scolaire que sociale. Mes parents m'ont inculqué la persévérance, le respect des engagements, des gens et des choses, ainsi qu'à être fort devant l'adversité. Ils m'ont appris aussi à penser par moi-même et à ne pas hésiter à remettre en cause les principes. Ces valeurs sont communes mais je pense qu'elles constituent des fondamentaux qui sont de moins en moins transmises aux jeunes générations. Ils m'ont toujours poussé à aller plus loin mais je pense qu'au niveau des études, je vais devoir arrêter là, je suis arrivé au bout.

Je dédie le mot de la fin, à Emilie, qui sait chaque jour partager mon quotidien. Je lui adresse un énorme merci pour sa patience en tant qu'interlocutrice, car je crois qu'elle aurait été capable d'écrire ce manuscrit à ma place mais surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée et qu'elle m'accorde chaque jour. Le résératrol s'est invité si souvent à la maison qu'il a même été le sujet de sa thèse de pharmacie. Ses encouragements et son amour sont les rails que j'ai suivis pour écrire ce manuscrit et pour cela je lui en suis très reconnaissant.



Table des matières



REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES.....	11
RESUME	19
ABSTRACT.....	23
LISTE DES ABREVIATIONS	27
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	31
• Publications	33
• Communication invitée	35
• Communications orales.....	35
• Poster	35
INTRODUCTION	1
I. LES METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES	5
i. <i>Présentation générale</i>	5
ii. <i>La synthèse des métabolites secondaires</i>	5
iii. <i>L'activité biologique des métabolites secondaires</i>	7
iv. <i>Différentes approches pour produire les métabolites secondaires</i>	9
II. MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES	11
i. <i>Mécanismes de défenses passifs</i>	11
1. Les barrières physiques	11
2. Les défenses chimiques.....	13
ii. <i>Mécanismes de défenses actifs</i>	15
1. La reconnaissance du pathogène	15
2. La signalisation	17
3. Les réponses de défense	19
a. Les acteurs de la défense	19
b. Organisation spatiale de la défense	25
III. LES STILBENES CHEZ LA VIGNE	27
i. <i>Voie de biosynthèse</i>	27
1. La stilbène synthase	27
2. Localisation de la synthèse du resvératrol	29
ii. <i>L'implication du resvératrol dans la défense de la vigne</i>	31
IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES DU RESVERATROL CHEZ L'ANIMAL	35
i. <i>Effet de protection du système cardiovasculaire</i>	37
ii. <i>Effet sur le cancer</i>	37
iii. <i>Effet sur les maladies neurodégénératives</i>	37
iv. <i>Effet sur le diabète</i>	41
v. <i>Effet antiviral</i>	41



vi.	<i>Effet sur l'espérance de vie</i>	43
vii.	<i>Effet sur la drépanocytose</i>	43
V.	L'UTILISATION ACTUELLE DU RESVERATROL	45
i.	<i>L'utilisation cosmétique</i>	45
ii.	<i>L'utilisation en tant que compléments alimentaires</i>	45
VI.	BIOTECHNOLOGIE VEGETALE ET MICROBIENNE : SOURCE DE MOLECULES D'INTERET	47
i.	<i>Emploi des microorganismes</i>	49
ii.	<i>Emploi de cultures cellulaires végétales</i>	51
1.	Historique	51
2.	Caractéristiques et utilisations de la culture végétale	53
a.	Présentation générale	53
b.	Variation des paramètres de culture	53
c.	Induction de la synthèse des métabolites	57
d.	Les différents systèmes de culture	59
e.	Utilisation des suspensions cellulaires	61
VII.	LA BIOTECHNOLOGIE COMME SOURCE DE RESVERATROL ?	61
PUBLICATION 1 : BIOPRODUCTION OF RESVERATROL AND STILBENES DERIVATIVES BY PLANT CELLS AND MICROORGANISMS.		63
OBJECTIFS		81
PARTIE 1 : CARACTERISATION DU MODELE DE CULTURE CELLULAIRE DE VITIS 41B ET APPLICATION A LA BIOPRODUCTION.		91
I.	DETERMINATION DES PROPRIETES DU SYSTEME ET ELICITATION : CROISSANCE, PRODUCTION DES STILBENES, CARACTERISATION ET APPLICATION A LA BIOPRODUCTION.	93
PUBLICATION 2 : BIOPRODUCTION OF RESVERATROL AND VINIFERINS BY AN ELICITED GRAPEVINE CELL CULTURE IN A 2L STIRRED BIOREACTOR		95
II.	ELEMENTS D'OPTIMISATION DE LA BIOPRODUCTION	111
i.	<i>Volume de culture</i>	111
ii.	<i>Adsorption du resvératrol</i>	113
III.	EFFET DU CHITOSAN SUR LE MODELE DE CULTURE	115
PUBLICATION 3 : EFFECT OF CHITOSAN AND METHYLJASMONATE ON RESVERATROL AND E-VINIFERIN PRODUCTIONS IN A GRAPEVINE CELL SUSPENSION		117
IV.	ACCUMULATION DU RESVERATROL ET METABOLISATION	133
V.	COMPARAISON DES PROPRIETES DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE <i>VITIS 41B</i> ET DE <i>VITIS LABRUSCA</i> CV. CONCORD	135
VI.	CONCLUSION	137



PARTIE 2 : CINETIQUE D'APPARITION DU RESVERATROL, LOCALISATION DE SA SYNTHESE ET MECANISMES D'EXCRETION.	139
I. INTRODUCTION	141
<i>i. Cinétique d'apparition du resvératrol</i>	141
1. Accumulation des ARNm de la STS	141
2. Analyse en HPLC de l'accumulation du resvératrol	143
<i>ii. Localisation de la synthèse du resvératrol</i>	143
1. Localisation dans la plante	143
2. Localisation cellulaire	145
<i>iii. Propriétés du resvératrol</i>	145
II. MATERIELS ET METHODES	147
<i>i. Le matériel végétal</i>	147
<i>ii. Préparation des suspensions cellulaires pour la microscopie</i>	147
<i>iii. Observation en vidéomicroscopie</i>	149
1. Acquisition des images	149
2. Quantification de l'intensité de la fluorescence	149
<i>iv. Observation en microscopie confocale</i>	151
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	153
<i>i. Cinétique d'apparition du resvératrol</i>	153
1. Observation microscopique	153
2. Quantification de l'intensité de fluorescence.....	153
<i>ii. Localisation de l'apparition du resvératrol et transport</i>	157
1. Observation de cellules incubées avec du resvératrol	157
2. Observation des cellules élicitées.....	157
3. Discussion.....	159
a. Le volume périphérique	159
b. Les zones à forte intensité de fluorescence	161
IV. CONCLUSION	163
DISCUSSION GENERALE.....	165
I. PROPRIETES DU SYSTEME DE SUSPENSION CELLULAIRE VITIS 41B.....	167
II. APPLICATION DU SYSTEME A L'ETUDE DE LA SYNTHESE DE RESVERATROL.....	169
III. CONCLUSIONS.....	171
IV. PERSPECTIVES	173
REFERENCES	177
ANNEXES	205



Résumé



Les stilbènes sont des composés phénoliques qui ont été caractérisés chez différentes espèces végétales et dont le représentant le plus connu est le *trans*-resvératrol (*trans*-3-5-4' trihydroxystilbène). Comme de nombreux métabolites secondaires, le resvératrol participe aux mécanismes de défense de la plante et a été décrit comme jouant un rôle de phytoalexine chez la vigne. Sa présence dans le vin a été associée au *French paradox* et a conduit à mettre en avant ses nombreuses activités biologiques potentiellement intéressantes pour la santé humaine. L'ensemble de ces éléments fait du resvératrol une molécule d'intérêt mais les mécanismes liés à sa biosynthèse en particulier au niveau cellulaire restent à approfondir. Ces mécanismes sont complexes et le recours à un modèle d'étude simplifié, comme des suspensions cellulaires, autorise un accès facilité aux études à l'échelle cellulaire. Au cours de ce travail, nous avons tenté d'apporter des précisions sur la capacité que peuvent offrir les suspensions cellulaires de vigne comme moyens d'étude du resvératrol.

Dans ce contexte, nous avons utilisé une suspension cellulaire de *Vitis* 41B établie à partir de cals. Dans un premier temps, les caractéristiques de cette suspension ont été déterminées, tant au niveau de sa croissance que de sa capacité à produire du resvératrol. Afin d'étudier les paramètres conduisant à cette synthèse, différents inducteurs de la production du resvératrol ont été testés. Le méthyl-jasmonate à la concentration de 0,2 mM s'est avéré le plus efficace. Le resvératrol produit est retrouvé majoritairement dans le milieu extracellulaire. Le scale-up en bioréacteur de 2 L a été réalisé et a conduit à la purification et à l'identification de viniférines en plus du resvératrol. Dans ces conditions, une concentration de resvératrol de 200 mg/L a été obtenue. Les résultats montrent également que la formation des viniférines semble directement liée à la métabolisation du resvératrol présent dans le milieu de culture.

La seconde partie du travail a consisté à caractériser la synthèse précoce du resvératrol à l'échelle cellulaire. La suspension 41B présente la caractéristique intéressante de ne pas synthétiser de resvératrol en absence d'éléciteur. L'utilisation de la vidéomicroscopie et de la microscopie confocale a permis de montrer que la synthèse du resvératrol était cytosolique et que son excréction est localisée, confirmant l'existence d'une excréction sous forme d'exocytose ou par l'implication de transporteurs actifs.

Ces travaux montrent clairement que les suspensions cellulaires de vigne représentent un système biotechnologique pertinent pour l'étude fondamentale de la biosynthèse du resvératrol et sa bioproduction.



Abstract



Stilbenes are phenolic compounds produced by different plant species. The most well known stilbene is the *trans*-resveratrol (*trans*-3-5-4' trihydroxystilbene). As some others secondary metabolites, resveratrol is a part of the plant defense mechanisms and acts as a phytoalexine on grapevine. Its discovery inside red wine linked it to the “French paradox” and led to enlighten its biological activities on human health. So the resveratrol became an interesting and hopeful molecule in medicine and also for understanding grapevine defenses but the biosynthetic mechanisms of this compound stayed unclear. Along this work, we tried to investigate the grapevine cell suspensions abilities to bring information on resveratrol biosynthesis.

In this context, we used a *Vitis 41B* cell suspensions obtained from calli. In a first time, the cell growth kinetic was determined and we evaluated its ability to produced resveratrol. In order to study parameters which led to the resveratrol synthesis, we have tested various inducers and a concentration of 0,2 mM methyljasmonate showed the best induction. The resveratrol was mainly accumulated inside the culture medium. A scale-up in a 2-L bioreactor was conducted and led to the purification and identification of viniferins and allowed to obtain a 200 mg/L resveratrol accumulation. These results seem indicate that the viniferin production is linked to the metabolisation of the resveratrol inside the culture medium.

The second part of this work focussed on the early synthesis of the resveratrol at the cellular scale. In fact, the 41B suspension has the characteristic to not produce resveratrol when no inducer was added. We have used videomicroscopy and confocal microscopy in order to show that the resveratrol synthesis takes place inside the cytosol and that its excretion is localized. These results suggest that resveratrol excretion could be associated with exocytosis mechanisms or the involvement of ABC transporters.

Our study clearly showed that the grapevine cell suspension represents a pertinent and powerful system to study the resveratrol biosynthesis and its bioproduction.



Liste des abréviations



2,4D	2,4 Dichlorophenoxyacetic acid
3D	3 Dimensions
AcOEt	Acétate d'éthyle
ANA	Acide Naphthalène Acétique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAP	Benzylaminopurine
CCD	Charged Coupled Device
CCM	Chromatographie Couche Mince
CHS	Chalcone Synthase
CO ₂	Dioxyde de Carbone
FPLC	Fast Performance liquid chromatography
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	High Performance liquid chromatography
HR	Réponse Hypersensible
ISR	Réponse Systémique Induite
JA	Acide Jasmonique
LAR	Réponse Locale Acquise
LDL	Low Density Lipoprotein
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MeJA	Méthyljasmonate
MeOH	Méthanol
MeSA	Salicylate de Méthyle
MIMP	Microbe-Induced Molecular Pattern
MS	Murashige et Skoog
O ₂	Dioxygène
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
PAL	Phénylalanine Ammonia-Lyase
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PR	Pathogenesis Related
PRR	Pattern Recognition Receptors
RPM	Rotation Par Minutes
SA	Acide Salicylique
SAR	Réponse Systémique Acquise
STS	Stilbène Synthase
TAL	Tyrosine Ammonia-Lyase
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultra-Violet



Liste des publications et des communications



- Publications

- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courrot, E., (2009). Bioproduction of *trans*-resveratrol and various stilbene derivatives in microorganisms and plant cells. Trends in Biotechnology, 27, 706-713.
- Courrot, E., Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., (2010). Production du resvératrol par voie biotechnologique: *déjà une réalité?* Biofutur, 314, 52-54.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Paradiso, F., Cocina, R.A., Bolettieri, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Courrot, E., (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering and biological functions of stilbene phytoalexins in plants; BioFactors, 36, 331-341.
- Donnez D., Kim K.H., Antoine S., Conreux A., De Luca V., Jeandet P., Clément C., Courrot E., (2010). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor. Process Biochemistry, accepté.
- Donnez D., Conreux A., Courteaux B., Jeandet P., Aït-Barka E., Clément C., Courrot E. (2011). Effect of chitosan and methyljasmonate on resveratrol and ϵ -viniferin productions in a grapevine cell suspension. En préparation pour Biochemical Engineering Journal.



- Communication invitée

- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courot E. (2010). Bioproduction of stilbenes from grapevine cell suspensions. Cool Climate Oenology and Viticulture Institute, Brock University, Saint Catharines, Ontario, Canada.

- Communications orales

- Donnez, D., Terryn, C., Jeandet, P., Jeannesson, P., Clément, C., Courot E., Study of the early synthesis of resveratrol and its localization in grapevine cell cultures. Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines, Macrowine 2010. 16-18 juin 2010, Turin, Italie.
- Donnez, D., Conreux, A., Aït-Barka, E., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., 2008. High *trans*-resveratrol production in cell suspension of Vitis using methyl jasmonate and chitosan. Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wines, Macrowine 2008. 4-6 juin 2008, Montpellier, France.

- Poster

- Donnez, D., Kim, K.H., Conreux, A., Jeandet, P., Clément, C., De Luca, V., Courot, E. (2010) Resveratrol and viniferins production using grapevine cells in flasks and in a 2L stirred bioreactor, Resveratrol 2010, 13-15 septembre 2010, Elsinore, Danemark.



Introduction



Etudier les métabolites secondaires végétaux permet de mieux comprendre leurs fonctions et leur importance pour la plante, notamment lorsqu'ils sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes. De plus, ces molécules présentent, pour nombre d'entre elles, des activités biologiques justifiant leur utilisation en médecine traditionnelle et dans la pharmacopée comme médicaments.

Le resvératrol, molécule de la famille des stilbènes, est une bonne illustration de l'engouement pour ces métabolites issus des plantes. Molécule emblématique de la vigne connue pour ses propriétés antifongiques, ses effets biologiques ont largement dépassé la frontière du règne Végétal. De fait, ses propriétés sur de nombreuses maladies humaines sont aujourd'hui largement documentées et feront l'objet d'une présentation dans le manuscrit. Toutefois, l'utilisation du resvératrol comme médicament, ou bien comme actif en cosmétique et en tant que compléments alimentaires, pourrait être limitée par son approvisionnement, notamment par les méthodes conduisant à sa purification à partir d'organes végétaux. Au cours de l'introduction de cette thèse de doctorat, les différentes sources conduisant à la production du resvératrol seront discutées. Plus particulièrement, la bioproduction qui représente un atout pour obtenir des métabolites présents en faible quantité chez les plantes, fera l'objet d'une description plus détaillée. Cependant, le niveau de production constitutif par l'utilisation de suspensions cellulaires végétales est souvent faible. Il est alors possible d'augmenter leur synthèse par diverses techniques et notamment en mimant l'action d'un pathogène par l'utilisation d'éliciteurs. Ces méthodes nécessitent une compréhension des mécanismes de défense dans leur globalité, afin de pouvoir interpréter les résultats. Une partie de l'introduction a donc été dédiée à ces mécanismes. L'ensemble de ces éléments permettront de justifier le choix de l'étude de la bioproduction des stilbènes par suspension cellulaire de vigne développé au cours de ce travail.



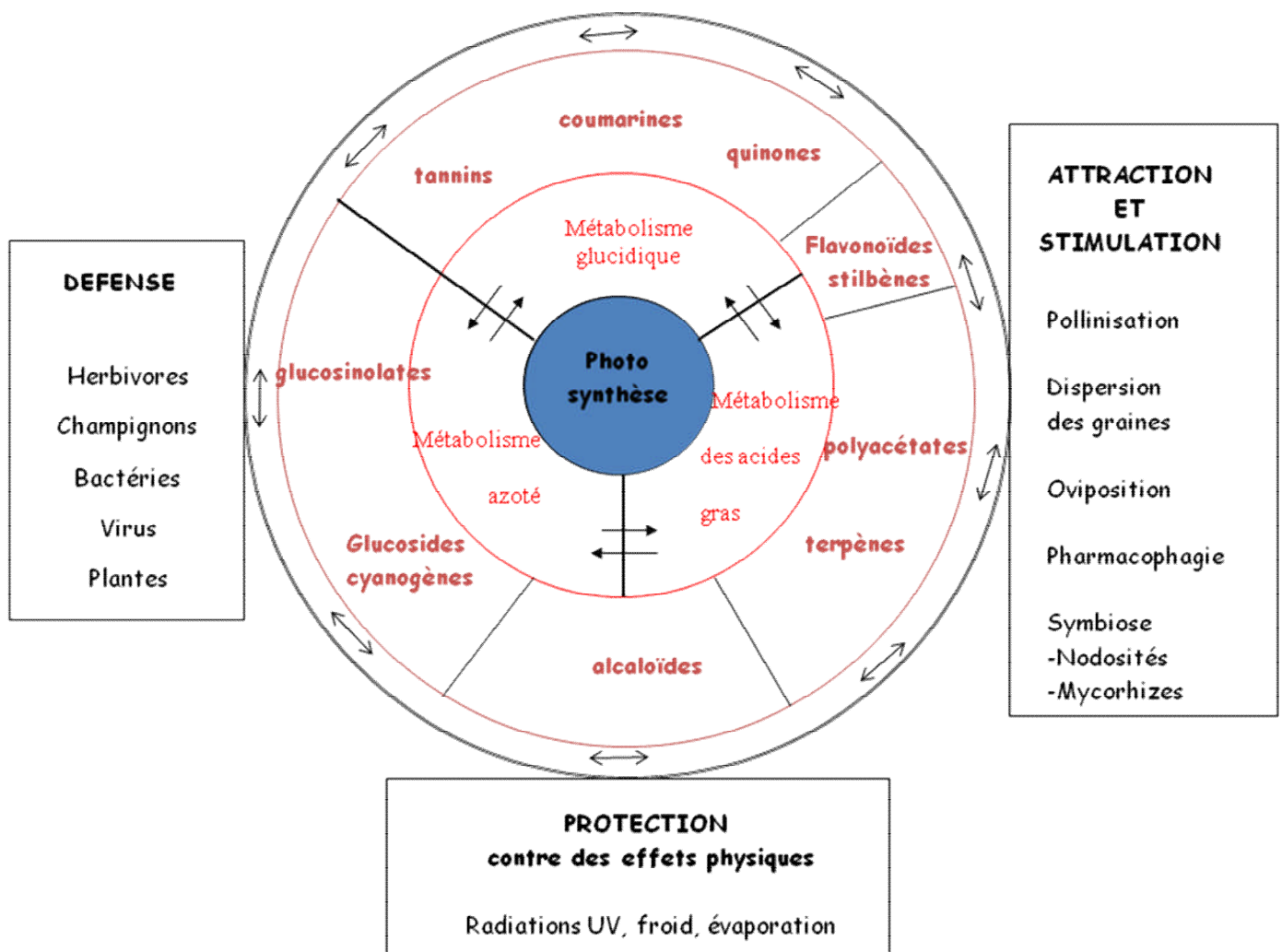


Figure 1 : diversité des métabolites secondaires et leurs principaux précurseurs issus du métabolisme primaire. Leurs rôles concernent tous les aspects des interactions chimiques des plantes avec l'environnement, notamment la défense contre les champignons, d'après Hartmann (1996).

I. Les métabolites secondaires des plantes

i. Présentation générale

Par opposition au métabolisme primaire qui régit les mécanismes de développement et de survie d'une cellule ou d'un organisme végétal, telles que la respiration, la reproduction ou la synthèse de protéines, le métabolisme secondaire est impliqué dans l'adaptation de la plante à ce qui l'entoure. Les métabolites secondaires sont des molécules de faible poids moléculaire qui représentent une interface entre la plante et son environnement (Kliebenstein, 2004). Ces molécules de familles et de structures chimiques variées possèdent des propriétés diversifiées. En effet, le métabolisme secondaire favorise, par exemple, la reproduction en rendant la plante plus attractive pour des pollinisateurs par la synthèse de pigments ou d'arômes. Il peut également interagir dans le maintien de la plante dans son milieu par une adaptation permettant, notamment, de résister au froid, à la salinité ou à d'autres stress abiotiques, en jouant sur le profil des métabolites présents dans l'organisme (Shualeyev *et al.*, 2008). Le métabolisme secondaire joue également un rôle dans la protection de la plante, en ajoutant aux défenses passives, telles que les épines ou la cuticule, une défense chimique permettant d'éloigner les animaux herbivores ou de lutter contre les microorganismes pathogènes. Les métabolites secondaires sont synthétisés à différents moments de la vie des plantes et sont constitutifs ou induits par un stress (van Etten *et al.*, 1994). Une baisse de l'hygrométrie, par exemple, met la plante dans une situation de sécheresse qui induit un changement de profil des métabolites secondaires (Shualeyev *et al.*, 2008).

ii. La synthèse des métabolites secondaires

La synthèse de ces métabolites utilise une grande variété de précurseurs. Ceux-ci peuvent être des acides aminés entrant dans la synthèse des phénylpropanoïdes ou des alcaloïdes, des acides organiques issus du cycle de Krebs pour la synthèse des terpènes, par exemple ou encore des glucides qui permettent l'obtention des dérivés glycosylés. Les voies de biosynthèse qui aboutissent à ces composés sont complexes et nécessitent l'intervention d'un grand nombre d'enzymes. Cette complexité permet d'aboutir à la très grande diversité



structurale et fonctionnelle des métabolites secondaires. De plus, la variabilité favorise l'obtention de composés ubiquistes dans le règne Végétal ou, à l'inverse, d'autres spécifiques à une famille ou à une espèce donnée (De Luca et S^t Pierre, 2000).

iii. L'activité biologique des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires jouent un rôle dans l'interaction des plantes avec leur environnement et par conséquent avec les autres organismes vivants. L'intégration de la plante dans son écosystème se fera grâce à l'activité biologique de ces métabolites intervenant dans les relations trophiques, comme la protection contre les herbivores ou la reproduction, avec l'attraction des pollinisateurs. Les anthocyanes, par exemple, appartenant à la famille des flavonoïdes, sont des composés aromatiques colorant les pétales et sont aussi impliquées dans la régulation des phénomènes redox (Forkmann et Martens, 2001). Toutefois les activités des flavonoïdes dans la défense des plantes se traduisent également par une inhibition, une répulsion ou un effet toxique vis-à-vis d'organismes agresseurs, comme les insectes et les microorganismes (Forkmann et Martens, 2001). Chez les Fabacées, les flavonoïdes interagissent avec les bactéries du genre *Rhizobium* dans l'instauration de la symbiose aboutissant à la formation des nodosités. En effet certains flavonoïdes comme le kaempferol ou le 7,4'-dihydroxyflavone, sont impliqués dans l'attraction des bactéries et provoquent la sécrétion par celles-ci du facteur Nod qui modifie la structure de la racine pour aboutir à la formation du nodule où s'installe la bactérie (Buer *et al.*, 2010).

Les alcaloïdes indoliques de la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) protègent la plante contre les animaux herbivores (Miranda-Ham *et al.*, 2007) par une inhibition de la formation du fuseau mitotique des cellules des animaux prédateurs. Cette propriété a été appliquée à la lutte contre le cancer (Lebret et Méjean, 2008). L'Homme a ainsi tiré profit des propriétés de ces molécules, de manière empirique dans les médecines traditionnelles puis de manière scientifique dans le cadre de la pharmacopée et de la médecine moderne (Verpoorte, 1998). Les exemples de l'atropine, issue de la belladone (*Atropa belladonna*), pouvant être utilisé en prévention et en traitement des infarctus du myocarde, de la codéine, issue du pavot (*Papaver somniferum*), pour son rôle analgésique et antitussif ou encore de la scopolamine, issue de certaines Solanacées, pour son effet anticholinergique (Fabricant et Farnsworth, 2001) en sont quelques illustrations.



iv. Différentes approches pour produire les métabolites secondaires

Ces molécules sont très utilisées dans différents domaines économiques comme l'agroalimentaire (colorants, arômes), le textile (pigments), la cosmétique (bases de parfumerie, antioxydants), les compléments alimentaires et représentent une source importante de principes actifs pour les médicaments pharmaceutiques. Le problème est d'obtenir ces molécules en quantité suffisante pour répondre à la demande sachant que les besoins en quantité peuvent être très variables selon l'utilisation. Dans le cas de l'artémisinine, issue de l'armoise, qui est actuellement utilisée dans le traitement de la malaria (Davis *et al.*, 2005), l'obtention de la molécule en grande quantité par culture en champ est possible. En effet, cette plante annuelle présente une croissance rapide et une résistance aux maladies qui rendent sa culture rentable et efficace (Pilloy, 2006). En revanche, pour d'autres molécules, comme le paclitaxel, la production n'est pas aussi aisée. Cette molécule anticancéreuse est synthétisée et accumulée au niveau de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*). L'if est un arbre à croissance lente et sa teneur faible en paclitaxel rend l'extraction compliquée : obtenir par cette voie le métabolite nécessite un grand nombre d'arbres (Chevassus-au-Louis, 2000). Dans ces conditions, une première méthode consiste à réaliser une héli-synthèse de la molécule à partir des composés présents dans les feuilles (en forme d'aiguille) de la plante tandis qu'une seconde méthode utilise des suspensions cellulaires d'if cultivées en grand volume (75000 Litres) (http://www.phytonbiotech.com/about_history.htm). Cette technique de culture *in vitro* a montré sa faisabilité mais n'est pas réalisable dans tous les cas. L'étude de la biosynthèse des vinca-alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar par culture cellulaire a montré l'incapacité des cellules à la produire la vinblastine et la vincristine. En effet, ces molécules sont des dimères composés de deux monomères alcaloïdiques différents, la catharanthine et la vindoline. Les suspensions sont capables de synthétiser la catharanthine mais pas la vindoline. La description récente de la voie de synthèse de la vindoline chez la plante entière a montré qu'elle était liée à une régulation cellule-, tissu- et organe-dépendant. Ainsi chaque étape est réalisée dans des cellules spécialisées localisées à des endroits différents de la feuille (St-Pierre *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2008). Cette spécialisation ne peut donc pas être reproduite avec des cultures dont les cellules sont différenciées.



II. Mécanismes de défense des plantes

Au cours de l'évolution, des adaptations morphologiques ont permis aux plantes de coloniser de nombreux environnements (Collin, 2001). La morphologie de la plante permet de limiter l'accès de celle-ci aux pathogènes. En effet, la co-évolution, qui existe entre les plantes et ses agresseurs, a permis la sélection de caractères visant à un équilibre entre la prolifération des pathogènes et la survie de la plante (Rauscher, 2001 ; Futuyma et Agrawal, 2009). Toutefois, dans le cas où les barrières physiques ou les défenses constitutives ne sont pas suffisantes, les sélections ont permis aux plantes d'obtenir des réponses actives induites de manière graduelle.

i. Mécanismes de défenses passifs

1. Les barrières physiques

L'épiderme est le tissu le plus externe retrouvé au niveau des organes aériens et représente non seulement le premier tissu mais aussi la première ligne de défense. Diverses adaptations de celui-ci permettent de limiter ou au moins de ralentir la pénétration des pathogènes. La présence d'une cuticule sur les feuilles peut, par exemple, freiner l'attaque de *Botrytis cinerea* chez *Arabidopsis thaliana* (Bessire *et al.*, 2007). L'épiderme peut aussi présenter la formation de trichomes simple ou glandulaires. Les trichomes glandulaires accumulent des métabolites de défense, qu'ils libèrent lors d'un contact avec un insecte, par exemple, permettant ainsi une protection de la plante (Wagner, 1991). Les trichomes simples jouent eux aussi un rôle important dans la défense. En effet, ils permettent de limiter le nombre de spores de champignon qui entrent en contact avec la surface de la feuille, inhibant ainsi la croissance du tube germinatif. Une corrélation entre la densité de trichomes et la protection de la plante a pu être mise en évidence (Stenglein *et al.*, 2005).

Les cellules de l'épiderme comme celles de toutes les cellules végétales possèdent une paroi. Cette structure est constituée d'un assemblage moléculaire complexe qui donne la forme à la cellule et la protège. La constitution de la paroi est différente en fonction de la plante, de l'âge et de l'organe mais d'une manière générale, elle est constituée d'une



matrice de cellulose sur laquelle se greffent de l'hémicellulose, des pectines et des glycoprotéines riches en hydroxyproline.

La paroi est aussi un lieu de circulation de liquide et de nutriments. Elle favorise la filtration des éléments qui arrivent au niveau de la membrane plasmique et constitue la première barrière cellulaire aux pathogènes (Showalter, 1993). La paroi freine le développement des agresseurs, qui doivent avoir recours à des enzymes capables de la dégrader ou des structures pouvant la percer, pour se nourrir du contenu intra-cellulaire. En plus de ces différentes propriétés, certains composés de la paroi, comme la cellulose ou la silice, sont décrits comme étant peu digestes pour les herbivores qui se nourrissent de la plante (Massey *et al.*, 2007).

2. Les défenses chimiques

Les plantes produisent des composés allélochimiques ou phytoanticipines (métabolites secondaires) qui leur permettent de lutter contre les attaques d'agresseurs. Ces composés sont définis comme des molécules de faible poids moléculaire possédant une activité antimicrobienne et qui sont retrouvés de manière constitutive au niveau de la plante (van Etten *et al.*, 1994). Ces composés de nature variée sont accumulés dans les parois ou au niveau de structures spécialisées, telles que le latex ou les trichomes glandulaires (Wittstock and Gershenzon, 2002).

Ces molécules agissent de différentes façons, mais celles-ci ne sont actives que si elles entrent en contact avec l'agresseur. Différentes adaptations ont permis aux plantes de se préserver de l'effet toxique de ces métabolites. La mise en place de cellules spécialisées dans le stockage de ces composés a été un avantage sélectif et est donc couramment observé chez les plantes, tout comme la glycolysation qui permet de réduire la toxicité de ces molécules en les piégeant au sein de la vacuole. En effet, les formes glycosylées sont souvent plus stables et moins actives que les formes aglycones (Jones et Vogt, 2001). Les glucosinolates illustrent cette propriété. Ils sont synthétisés chez les plantes de l'ordre des Capparales où ils sont présents dans de nombreux tissus pour lutter contre les insectes. L'enzyme, une thioglucosidase, permettant l'activation de ces composés par déglycosylation est conservée dans le cytoplasme des cellules spécialisées alors que le substrat est accumulé dans les vacuoles. Lorsque les tissus sont endommagés, les enzymes entrent alors en contact avec leurs substrats pour les transformer en molécules toxiques (Wittstock and Gershenzon, 2002).



Les phytoanticipines ont des actions à différents niveaux chez les pathogènes ou les herbivores. Ces molécules permettent de limiter ou de stopper une attaque. La morphine, produite par le pavot, agit sur le système nerveux central des animaux en se fixant sur les récepteurs opioïdes, mais une autre application a récemment été décrite. Après une blessure, la morphine est rapidement dimérisée en bismorphine, qui s'accumule dans la paroi en se liant à la pectine. Son action limite l'hydrolyse de la paroi par des pectinases (Morimoto *et al.*, 2001). D'autres métabolites comme les saponines agissent en déstabilisant les membranes plasmiques fongiques (Osbourn, 1996).

ii. Mécanismes de défenses actifs

La mise en place de la protection de la plante s'articule autour de trois étapes clés indissociables : la reconnaissance, la signalisation et la défense. Si l'une d'elle est défaillante la plante sera sensible à l'attaque. Chacune de ces étapes est plus ou moins spécifique au type de pathogène.

1. La reconnaissance du pathogène

L'immunité non-spécifique ou immunité innée primaire se met en place lors de la reconnaissance d'un large panel d'agresseurs. Ce phénomène est le plus courant dans l'interaction entre les plantes et les pathogènes. Il est matérialisé lors de la reconnaissance par la plante d'un MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) ou un MIMP (Microbe-Induced Molecular Pattern) appelés aussi éliciteurs généraux. Les MAMPs ont la particularité d'être commun à un large panel d'agents pathogènes comme par exemple la flagelline, protéine constituant le flagelle des bactéries flagellées, les oligosaccharides issu de la dégradation des parois ou la chitine, constituant majeur de la paroi des champignons. Les MIMPs sont des modifications de la plante effectuées par un pathogène, comme par exemple des fragments issus de la dégradation de la paroi végétale (Jones et Takemoto, 2004). Les MAMPs représentent la reconnaissance du non-soi et les MIMPs, la reconnaissance du soi modifié.

Les éliciteurs généraux sont reconnus par des récepteurs transmembranaires appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors), la perception de l'agresseur a donc lieu à l'extérieur de la cellule (Kauffmann *et al.*, 2009) (Figure 2 A). La liaison d'un éliciteur à son récepteur



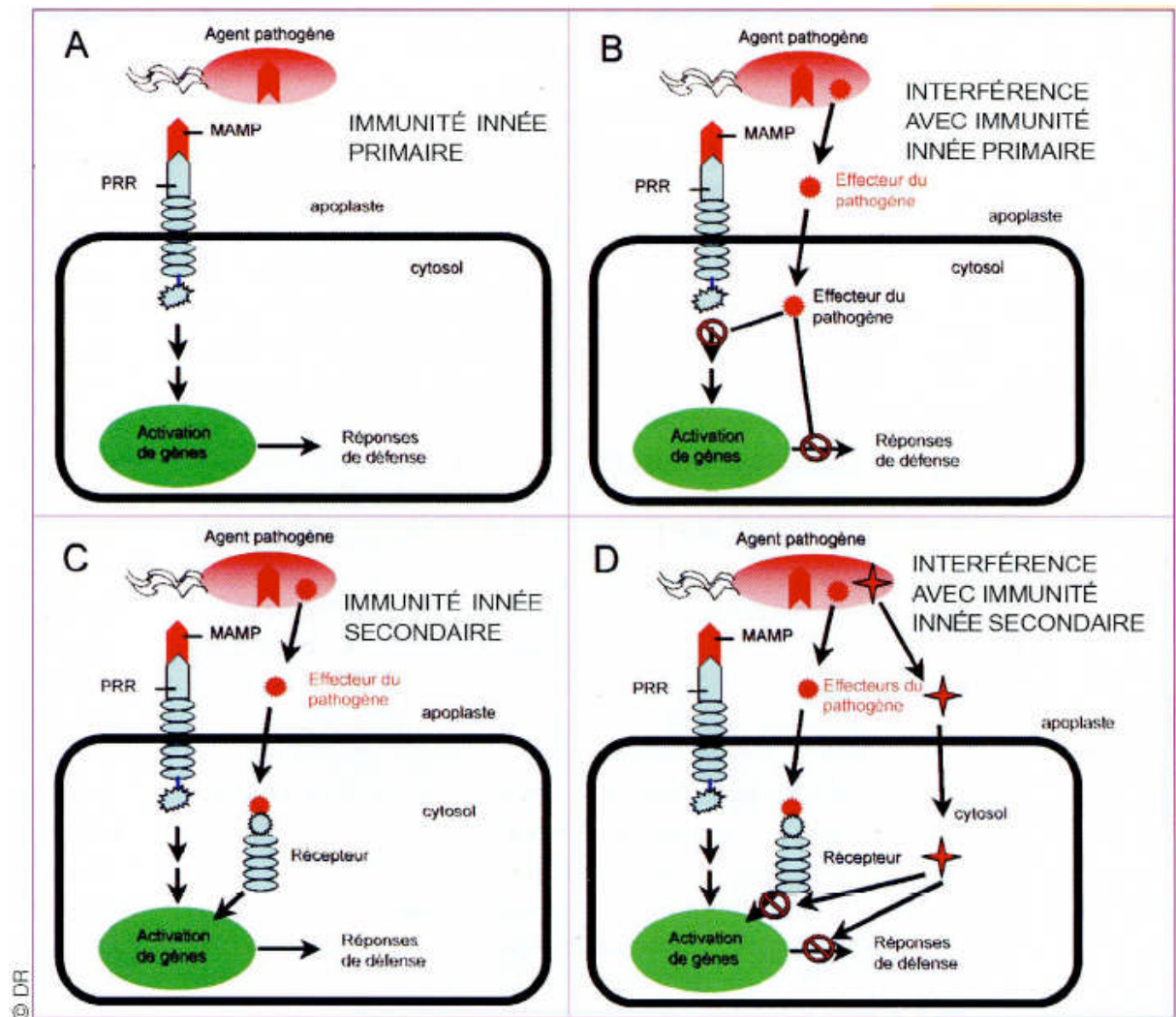


Figure 2 : Modèle d'évolution de l'immunité chez les végétaux (d'après Boller et He, 2009)

A : L'immunité innée est enclenchée par la détection de MAMPs.

B : L'agent pathogène contourne l'immunité innée primaire par des effecteurs inhibant les voies de signalisation ou la production des molécules de défense de la plante hôte.

C : L'immunité innée secondaire se met en place lorsque la plante hôte reconnaît les effecteurs ou l'activité de ces effecteurs.

D : L'agent pathogène contourne l'immunité innée secondaire en produisant de nouveaux effecteurs échappant à la reconnaissance ou inhibant l'activité des récepteurs existants.

induit une cascade de signalisation, qui aboutit à la mise en place des réponses de défense (Thordal-Christensen, 2003).

Les pathogènes ont acquis la capacité lors d'un mécanisme coévolutif et par l'utilisation d'effecteurs de bloquer la signalisation, l'activation des gènes de défense ou ses effets (Figure 2 B). Dans ce cas, la plante devient sensible aux pathogènes. La coévolution conduit à nouveau à l'acquisition par la plante d'un récepteur spécifique capable de reconnaître l'effecteur du pathogène, reconnaissance gène-pour-gène (Flor, 1942). Ce qui a abouti à la mise en place de d'une immunité spécifique ou immunité innée secondaire (Figure 2 C). Les pathogènes peuvent s'adapter en présentant un nouvel effecteur capable de contourner la reconnaissance innée secondaire (Figure 2 D). La plante s'adaptera en développant un nouveau récepteur (Jones and Dangl, 2006).

2. La signalisation

La signalisation s'effectue sur différents niveaux depuis l'échelle cellulaire jusqu'à la plante entière et même à la population végétale. La reconnaissance du pathogène est suivie de manière très rapide par la signalisation dite précoce. Celle-ci se manifeste à l'échelle cellulaire entre autre par un influx d'ions Ca^{2+} , la formation de formes activées de l'oxygène, ainsi que l'activation de la cascade des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Kauffmann et al., 2009).

Ces différents événements entraînent une modification de l'expression de gènes qui aboutissent à la mise en place de la défense. Tous ces facteurs varient dans le temps et dans leur intensité en fonction du pathogène ou de l'éliciteur reconnu (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). L'expression des gènes conduit notamment à la synthèse de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène. Ces phytohormones sont les messagers secondaires intervenant dans la communication intercellulaire et la signalisation systémique.

La signalisation par le SA conduit à une défense contre les microorganismes biotrophes. Le JA, son dérivé méthylé : le méthyljasmonate (MeJA) et l'éthylène sont impliqués en particulier, dans la défense contre les nécrotrophes, les insectes herbivores et la réponse aux blessures (Pieterse *et al.*, 2009). La défense mise en place sera moins spécifique de l'agresseur que celle signalée par le SA, mais s'accompagne d'une sécrétion de molécules volatiles ayant un rôle direct ou indirect sur les insectes (Howe et Jander, 2008). Les voies de signalisation du SA, du JA et de l'éthylène peuvent être agoniste ou antagoniste selon les cas (Figure 3).



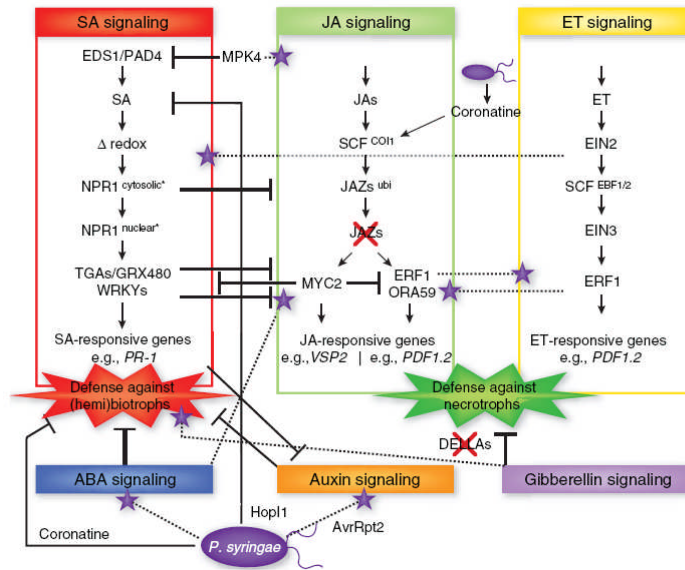


Figure 3 : Schéma représentant les interactions possibles entre les voies de signalisation au SA, au JA et à l'éthylène. (d'après Pieterse *et al.*, 2009)

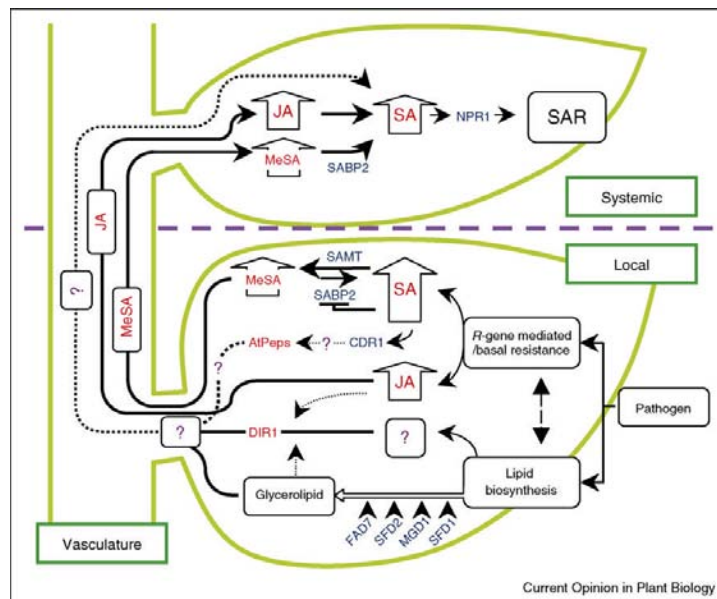


Figure 4 : Schéma représentant les différents signaux décrit comme pouvant participer à la mise en place de la SAR (d'après Vlot *et al.*, 2008).

La signalisation au SA a été caractérisée comme aboutissant au phénomène de réponse systémique acquise (SAR). En effet, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* et du tabac incapables de synthétiser le SA ne présente pas de SAR (Durrant et Dong, 2004). Le SA est synthétisé en grande quantité au niveau de la zone de reconnaissance où il joue un rôle dans la mise en place des réponses locales, mais il est impliqué aussi dans la communication intercellulaire. Le rôle de messenger à longue distance est préférentiellement attribué à son dérivé possédant un groupement méthyle, le salicylate de méthyle (MeSA). Le MeSA est une molécule volatile facilement transportable au sein de la plante. Il pourrait même être à l'origine d'une communication inter-plantes, utilisé pour propager l'information de l'attaque de pathogènes aux plantes voisines non infectées (Heil et Ton, 2008). Le MeSA est donc véhiculé au travers de la plante jusqu'aux organes cibles. Ensuite par l'action d'une estérase, le MeSA est scindé et le SA est libéré (Figure 4). Accumulé en faible quantité au niveau de chaque organe de la plante, le SA active l'expression de nombreux gènes et entraîne une mise en veille de la défense. Ce phénomène peut conférer à la plante une défense efficace dans le cas d'une nouvelle attaque de pathogènes biotrophes (Pieterse *et al.*, 2009).

3. Les réponses de défense

a. Les acteurs de la défense

– Les modifications morphologiques

Une des premières réactions de défense observée est la modification morphologique au niveau cellulaire. La cellule végétale modifie les propriétés de sa paroi avec pour conséquence le ralentissement de la pénétration du pathogène ou la diminution de la digestibilité de la plante pour un herbivore. Cette modification se traduit par une accumulation de différents composés tels que la callose ou la lignine. Une papille peut alors être formée entre la membrane et la paroi par l'accumulation de ces molécules au point d'insertion d'un hyphes ou d'un appressorium (Lepoivre, 2003). De plus des protéines riches en glycine (GRP : Glycine Rich Protein), proline (PRP : Proline Rich Protein), hydroxyproline (HPRP : HydroxyProline Rich Protein), qui constituent la paroi, sont oxydées sous l'effet de peroxydases et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) présent suite à la reconnaissance de l'agresseur. Ces molécules



Tableau 1 : Les différentes familles de protéines PR, leurs espèces d'origines, activités et principaux gènes (d'après van Loon *et al.*, 2006).

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

deviennent alors insolubles et participent au renforcement des parois (Lepoivre, 2003).

– La réponse hypersensible

L'acide salicylique, fortement concentré après sa synthèse au niveau du site d'invasion des pathogènes, ainsi que le rapport de la quantité de NO en fonction de la quantité de H_2O_2 sont impliqués dans la régulation de la mise en place d'un phénomène de mort cellulaire programmée (Lam, 2004). Ce phénomène est appelé réponse hypersensible (HR) et est caractérisé par la mort cellulaire programmée des cellules entrées en contact avec le pathogène et formant une zone de nécrose. Cette stratégie est particulièrement efficace dans le cas de pathogènes biotrophes et des virus (Glazebrook, 2005). Toutefois la HR est inutile dans le cas de nécrotrophes.

– Les protéines « Pathogenesis-Related »

Les protéines Pathogenesis-Related (PR) sont synthétisées par la plante dans le cadre de la réponse aux stress. Ces protéines, classées en 17 familles (Tableau 1), sont ubiquistes dans le règne Végétal, mais chaque espèce ne présente pas toutes ces familles.

Les protéines PR constituent un ensemble de molécules pouvant avoir une action directe ou indirecte sur les pathogènes. Les plus étudiées d'entre elles sont les chitinases et les glucanases. Ces deux groupes montrent des actions directes contre les parois des pathogènes microbiens. Les chitinases sont des enzymes capables de dégrader la chitine, qui est le constituant majoritaire de la paroi des champignons (van Loon *et al.*, 2006).

Par des approches de transgénèse, une synergie entre les différentes protéines PR a été mise en évidence. En effet, la surexpression de deux ou plusieurs d'entre elles conduit à un niveau de protection supérieur à l'effet cumulé de la surexpression de chaque protéine PR individuellement (Jongedijk *et al.*, 1995). Les protéines PR représentent donc des acteurs incontournables de la défense des plantes.



– Les phytoalexines

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, synthétisées en réponse à un stress et présentant une activité antimicrobienne (van Etten *et al.*, 1994). Elles se distinguent des phytoanticipines par le caractère inductible de leur synthèse. Cette terminologie peut se complexifier lorsqu'une molécule est constitutive dans un organe donné et inductible dans un autre organe de la même plante. C'est le cas, par exemple, de la momilactone A qui est constitutive dans les tiges du riz mais induite dans les feuilles (Grayer et Kokubun, 2001). La sakuranetine (un flavonoïde) est synthétisée de manière constitutive dans les feuilles de cassis et se trouve définie comme une phytoanticipine chez cette plante. En revanche, chez le riz où elle est induite par un stress, elle sera décrite comme phytoalexine.

Les phytoalexines ont été découvertes en 1911 par un chercheur français, Noël Bernard. Il travaillait sur les orchidées et avait découvert que deux espèces devenaient résistantes à une attaque fongique, après avoir subi une attaque par *Rhizoctonia repens*. Lorsqu'il plaçait les tubercules infestés sur de l'agar en présence de champignons, un inhibiteur de la croissance fongique semblait avoir été excrété par la plante. Il ne put cependant identifier ces molécules. En 1940, Müller et Börger observèrent un phénomène identique avec des tubercules de pomme de terre et qualifièrent ces molécules de phytoalexines, n'incluant que l'induction par des pathogènes fongiques dans la définition (Müller et Börger, 1940). Avec l'approfondissement des connaissances dans ce domaine, Van Etten publie en 1994 la définition actuelle des phytoalexines et définit dans le même temps le concept des phytoanticipines (van Etten *et al.*, 1994 ; Grayer et Kokubun, 2001).

Des composés très variés répondent à la définition du concept de phytoalexine. Ce sont des métabolites secondaires variés comme des polyphénols de type flavonoïde ou stilbénique, des alcaloïdes ou des terpènes. L'espèce végétale et le type de phytoalexines synthétisées sont souvent décrits comme étant liés, mais une famille de plantes peut utiliser comme phytoalexines plusieurs composés de différentes familles. Les phytoalexines sont reconnues comme ayant des propriétés antimicrobiennes mais leur spectre d'action est plus large (Harborne, 1999). Cela a pu être observée sur des plants de cacahuète en champ, où les plants qui présentent une plus forte accumulation de phytoalexines montrent une meilleure résistance et un développement moindre des maladies fongiques, virales et dues à des insectes (Sobolev *et al.*, 2007).



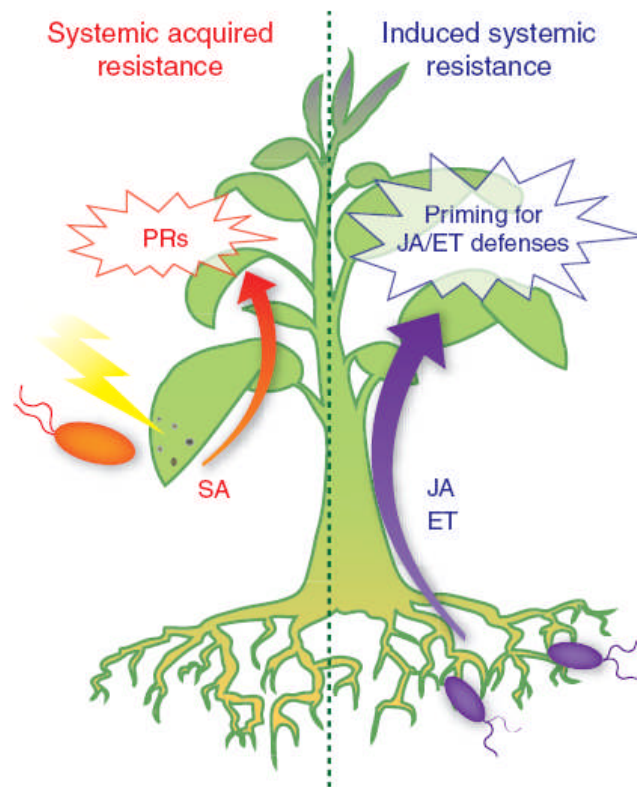


Figure 5 : Schéma illustrant la mise en place et la signalisation impliqué dans la SAR et l'ISR. (d'après Pieterse *et al.*, 2009)

b. Organisation spatiale de la défense

Deux zones de défense hiérarchisées sont couramment décrites : celle qui entoure le point de pénétration du pathogène et celle qui représente le reste de la plante.

– La réponse locale

Le premier niveau de défense se situe au point d'infection par le pathogène. Autour de cette zone, la plante exprime la totalité de ses moyens de défense. Le but est de réaliser un barrage à tous les types d'agresseurs, en rendant cette zone inaccessible et inhospitalière (Klarzynski et Fritig, 2001). Les cellules ayant subi l'attaque peuvent présenter un phénomène de HR qui a comme conséquence de limiter l'invasion des pathogènes biotrophes. Avec ou sans présence de HR, la plante crée une zone de réponse locale acquise (LAR), qui est caractérisée par l'expression des gènes de défense codant les protéines PR, ainsi que les enzymes impliquées dans la voie métabolique des phytoalexines. De plus, les cellules présentent un renforcement de leur paroi, grâce notamment à l'accumulation de lignine ou de callose et la formation de papilles au niveau de la zone de pénétration (Mysore et Ryu, 2004).

– La réponse systémique

En plus de la réponse locale, une réponse systémique existe. Lors de la première attaque, la plante présente à l'échelle systémique une absence ou une faible induction des défenses. Lors d'une nouvelle attaque, la plante pourra répondre de manière plus rapide et plus intense. Ce phénomène est appelé potentialisation et correspond à un état de veille. Celui-ci apparaît suite à deux types d'évènements. Après une attaque par un pathogène, une SAR se met en place au niveau de tous les organes de la plante. Un message circule depuis la zone de pénétration de l'agresseur ou la zone en contact de l'éliciteur et permet l'activation de l'état de veille (Ryals *et al.*, 1996). Le second mécanisme appelé réponse systémique induite (ISR) est initié lors de la reconnaissance d'un microorganisme non-pathogène, de type PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) par exemple. D'une manière générale le messenger utilisé dans le cadre de la SAR est le SA et de l'ISR le JA et l'éthylène (Figure 5) (Pieterse *et al.*, 2009).



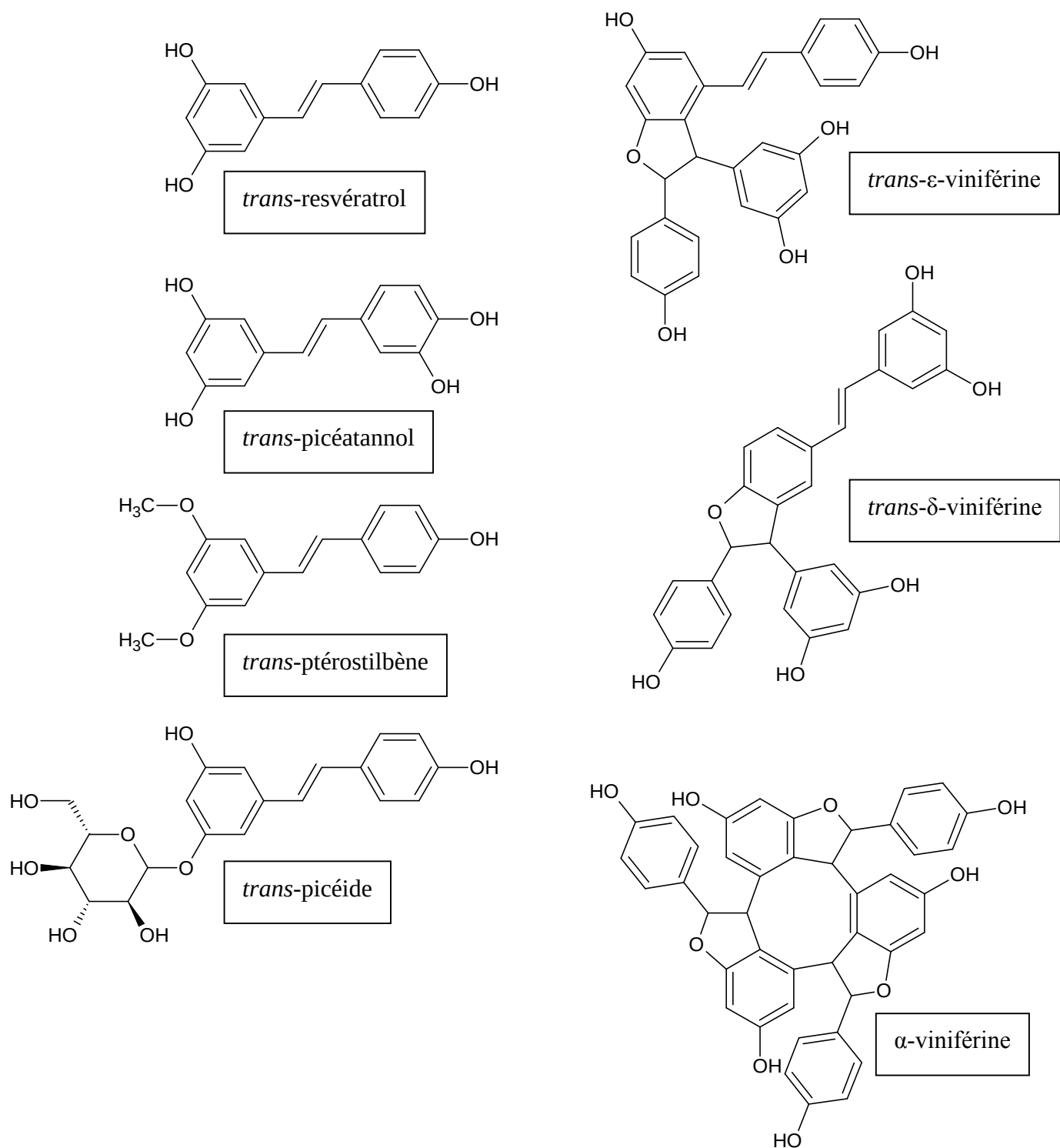


Figure 6 : Formule chimique des principaux stilbènes.

III. Les stilbènes chez la vigne

i. Voie de biosynthèse

Les stilbènes ont une voie métabolique relativement simple qui est décrite dans l'article 1 (Donnez *et al.*, 2009). Le plus souvent, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est décrite comme étant la première enzyme et l'enzyme clé de cette voie métabolique chez la vigne. Ainsi la phénylalanine, issue de la voie des shikimates, représente le précurseur majoritaire de cette réaction. La synthèse *de novo* et l'activation de cette enzyme est liées aux stress et en particulier aux attaques de pathogènes (Jeandet *et al.*, 2010). Toutefois la tyrosine ammonia-lyase (TAL), enzyme moins étudiée, pourrait elle aussi avoir un rôle important dans cette voie métabolique en permettant notamment de s'affranchir d'une étape. La dernière enzyme de la voie, la stilbène synthase (STS) catalyse la réaction conduisant directement au *trans*-resvératrol à partir d'un coumaroyl-CoA et de trois malonyl-CoA (Jeandet *et al.*, 2010). Le resvératrol représente le premier membre de la famille des stilbènes et l'unité de base conduisant par dimérisation, glycolysation, méthylation, ... aux autres stilbènes (Figure 6). Même si d'autres monomères dérivés existent, comme le picéatannol, le resvératrol est la forme majoritaire chez la vigne (Jeandet *et al.*, 2010).

1. La stilbène synthase

La stilbène synthase est l'enzyme qui catalyse la condensation du coumaroyl-CoA et de trois malonyl-CoA, issus de la voie des polymalonates pour conduire à la formation du resvératrol. Il s'agit donc de l'enzyme clé de la voie de biosynthèse. La STS connaît une dualité avec la chalcone synthase (CHS). Ces deux enzymes utilisent le même substrat et présentent une forte homologie, entre 75 et 95% à l'échelle des amino-acides et au moins 70% au niveau de la protéine chez *Arachis hypogea* (Chong *et al.*, 2009 ; Jeandet *et al.*, 2010). Les réactions que chacune d'entre elles catalysent sont très proches, mais la cyclisation finale qu'elles induisent aboutit à deux composés très différents. La CHS forme une chalcone qui est un composé en C15 précurseur de la voie des flavonoïdes, la STS permet l'obtention du resvératrol.



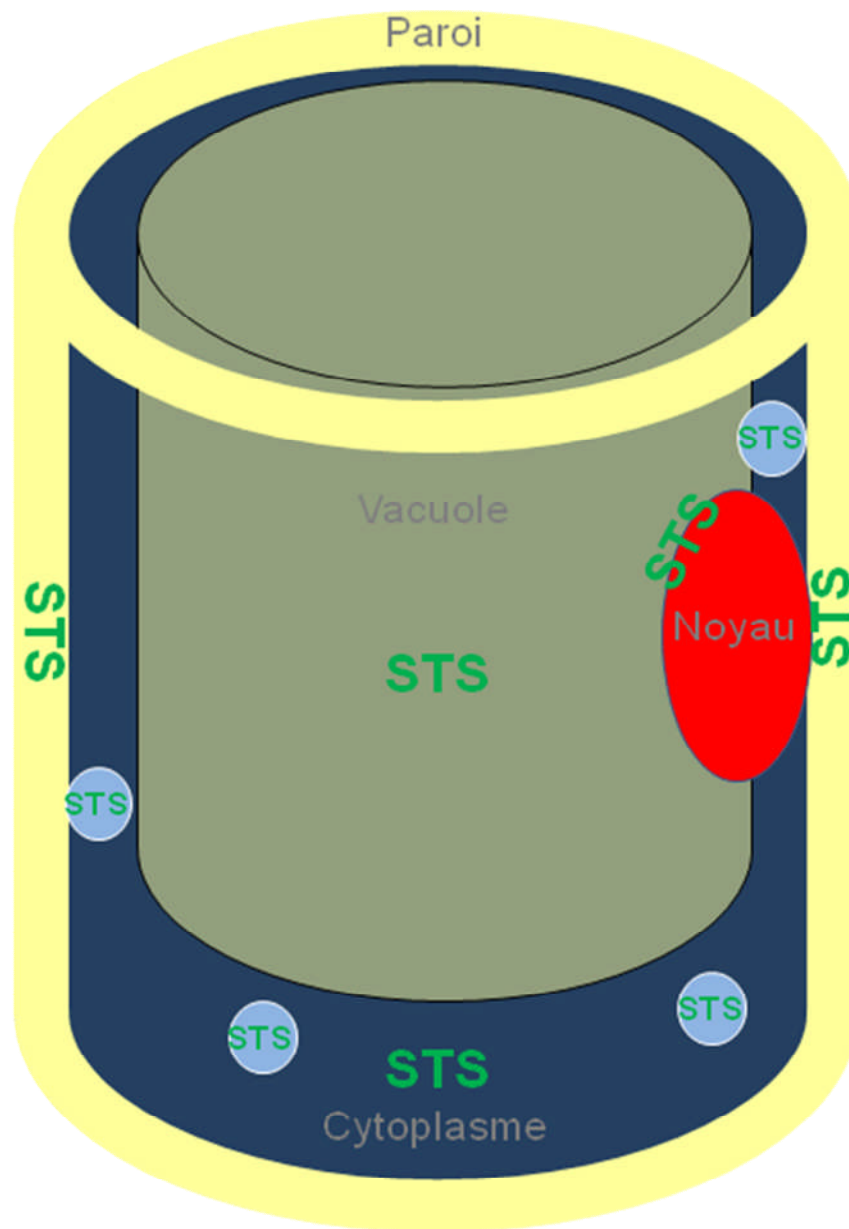


Figure 7 : Représentation schématique d'une cellule végétale présentant la localisation de la STS, défini par immunolocalisation. La STS est présente au niveau de la paroi, du cytoplasme de manière libre ou dans des vésicules de différentes tailles, ainsi que dans une moindre mesure au niveau de la vacuole et de l'enveloppe du noyau.

La STS représente une enzyme importante chez la vigne par l'implication dans la défense des composés qu'elle permet de synthétiser. Au niveau du génome de la vigne (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir), 43 gènes codant pour la STS ont été identifiés, dont une vingtaine avaient été déjà décrits comme étant exprimés (Jaillon *et al.*, 2007). Cette multiplication du nombre de copies, identiques ou non, laisse penser que l'étude des mécanismes régulant la synthèse du resvératrol est complexe. Il semble alors impossible d'envisager d'étudier les mécanismes de l'induction de la synthèse de resvératrol en focalisant uniquement sur le comportement des gènes codant pour la STS. Une vision plus globale intégrant le suivi de la molécule semble alors nécessaire.

De nombreuses études se sont toutefois intéressées à l'évolution de l'expression des gènes de la STS sous différentes conditions. Ainsi, l'accumulation des ARNm codant pour la STS a lieu en deux vagues successives. Ce comportement en deux temps de l'expression des gènes a pu être confirmé par une accumulation en deux vagues successives du resvératrol sur feuille après une induction par les UV-C (Jeandet *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010).

2. Localisation de la synthèse du resvératrol

Le dosage du resvératrol constitutif dans différents organes de plantules de vigne a montré que celui-ci était retrouvé principalement dans le phloème de la tige, dans les bourgeons axillaires et dans les racines (Wang *et al.*, 2010). Afin de mieux déterminer les lieux de cette synthèse, une localisation de la STS a été réalisée par immunolocalisation dans ces différents organes et montre que cette enzyme est localisée dans les feuilles en majorité, mais aussi dans le pétiole et dans la tige autour des vaisseaux conducteurs de phloème et de xylème, ainsi qu'au niveau du mésocarpe et de l'exocarpe des baies (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Le resvératrol serait produit dans les organes aériens et conduit par le phloème à travers toute la plante et jusqu'aux racines (Wang *et al.*, 2010). La STS serait ubiquiste au niveau cellulaire chez la vigne (Figure 7) puisqu'elle a été trouvée dans la paroi et dans des vésicules cytoplasmiques de différentes tailles au niveau de l'exocarpe des baies (Fornara *et al.*, 2008) et des feuilles où elles se retrouvent également au niveau de la vacuole, du cytoplasme et même du noyau (Wang *et al.*, 2010).



ii. L'implication du resvératrol dans la défense de la vigne

En fonction des espèces et des cultivars (cépages), la résistance de la vigne aux pathogènes est différente. En effet, certaines espèces montrent une résistance importante, c'est le cas notamment des espèces sauvages (*Vitis riparia*, ...) et américaines (*V. berlandieri*, *V. rupestris*, *V. labrusca*, ...). En revanche, l'espèce européenne, *Vitis vinifera* L., utilisée en majorité pour l'élaboration des vins est connue pour être sensible à de nombreuses maladies (Schnee *et al.*, 2008). Les maladies les plus fréquentes de la vigne sont des maladies cryptogamiques, comme l'oïdium, la pourriture grise et le mildiou. Dans ce cas, un seul champignon attaque la plante par les parties aériennes. Ces maladies apparaissent à certains stades de développement de la vigne et causent, le plus souvent, des pertes de rendements et de qualité organoleptique des vins (Ough et Berg, 1979 ; Marchal *et al.*, 2001 ; Stummer *et al.*, 2003). Les maladies du bois, dont les agents pathogènes sont souvent constitués de plusieurs souches de champignons se développent aux niveaux des ceps et peuvent causer la mort de la plante (Larignon *et al.*, 2009).

Le resvératrol et les stilbènes en général sont décrits comme possédant une activité antifongique (Jeandet *et al.*, 2002) mais les mécanismes d'action réels de ces composés sur les champignons sont peu décrits. Le ptérostilbène et les viniférines posséderaient une action antifongique plus forte que le resvératrol, en particulier que ses formes glycosylées (Adrian *et al.*, 1997 ; Schnee *et al.*, 2008). En effet, l'efficacité du resvératrol n'est pas liée qu'à l'induction de sa synthèse, mais aussi à sa métabolisation. Dans le cas d'une attaque d'oïdium (*Erysiphe necator* Schwein), si le resvératrol est dérivé sous la forme de picéides internalisés dans la vacuole, la vigne montre alors une sensibilité vis-à-vis du champignon. En revanche, si le resvératrol est excrété et dimérisé sous forme d' ϵ - ou de δ -viniférines, le cépage est résistant (Schnee *et al.*, 2008). Les mêmes conclusions avaient été obtenues avec le mildiou, dont l'agent pathogène est *Plasmopara viticola* (Pezet *et al.*, 2003). Les mécanismes d'action du resvératrol et de certains dérivés ont été également étudiés *in vitro* vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Le resvératrol (100 à 160 mg/L) et le ptérostilbène (20 à 60 mg/L) montrent une inhibition de la germination des conidies de *Botrytis cinerea*, respectivement de 50 à 100%. Ils induisent aussi une diminution de la croissance en longueur de l'hyphe de 94% en 64 heures pour une concentration en ptérostilbène de 40 mg/L et d'environ 80% avec une concentration de resvératrol de 140 mg/L. Le resvératrol inhibe la croissance de l'hyphe et provoque des modifications morphologiques importantes, comme la déstructuration de sa paroi, la mort de la cellule apicale, la formation de deux à trois tubes germinatifs ou encore la



courbure de ce tube (Adrian *et al.*, 1997).

La régulation de la synthèse du resvératrol est organe dépendant. Dans le bois de la vigne, le resvératrol est retrouvé de manière constitutive (Langcake et Pryce, 1976). Sa présence est associée des dérivés plus complexes, représentés par des oligomères formés à partir de 2, 3 ou même 4 unités resvératrol. La fonction de ces molécules est inconnue mais elles limitent probablement l'installation de champignons dans le bois. Cette action a pu être démontré pour la pinosylvine, qui est un homologue du resvératrol synthétisé par le pin (Chong *et al.*, 2009). En revanche, la présence du resvératrol, au niveau des feuilles (Langcake et Pryce, 1977) et des baies (Jeandet *et al.*, 1991), n'est observée qu'après une induction des défenses (Chong *et al.*, 2009) qui peut être une attaque de pathogène (Jeandet *et al.*, 1995a), ou un contact de la plante avec des molécules élicitrices (Tassoni *et al.*, 2005). Les stress abiotiques, comme les UV-C ou une blessure peuvent eux aussi induire la synthèse du resvératrol (Adrian *et al.*, 2000 ; Bonomelli *et al.*, 2004). Ces inductions entraînent une accumulation transitoire de resvératrol au niveau des feuilles et des baies.

Ainsi, en complément des autres moyens de défense mis en place par la vigne, les stilbènes jouent un rôle non négligeable dans la lutte contre les pathogènes. Ceci ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle du resvératrol dans la défense de la vigne contre les maladies fongiques. La dimérisation du resvératrol en viniférines par l'action de peroxydases (Pezet *et al.*, 2003), (enzymes décrites par ailleurs comme protéines PR), permettrait d'envisager une action synergique entre une phytoalexine et une protéine PR. Cette réaction nécessite du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit à l'occasion de la signalisation précoce. Cette hypothèse serait intéressante à vérifier pour prouver une synergie entre les mécanismes de défense chez la vigne.



IV. Activités biologiques du resvératrol chez l'animal

Le resvératrol (*trans*-resvératrol ou 3,5,4'-trihydroxystilbène) est le stilbène le plus étudié pour ses propriétés dans la défense des plantes mais il fait surtout l'objet de recherches intensives pour ses potentielles propriétés thérapeutiques. Sa découverte dans l'hellébore blanche (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) en 1940 par Takaoka, lui a valu son nom d'usage (Takaoka, 1940). Il a été isolé ensuite des racines de *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. et du thé Itadori (ou Ko-jo-kon) qui est une infusion de ses racines (Nonomura *et al.*, 1963). Ce thé était utilisé dans les médecines traditionnelles chinoise et japonaise pour lutter contre le favisme, certaines mycoses, les infections bactériennes et contre les hyperlipidémies (Arichi *et al.*, 1982). L'intérêt pour le resvératrol s'est accru après sa découverte dans le vin rouge et son implication potentielle dans le « French paradox ». Ce paradoxe français provient des conclusions d'une étude américaine dont le but était de comparer une population humaine américaine à une population du sud-ouest de la France dans les années 1980 (Renaud et De Lorgeril, 1992). Les deux populations étudiées avaient un régime alimentaire riche en lipides mais, curieusement, la population française souffrait moins de problèmes cardiaques que la population américaine. Cette différence avait alors été expliquée par la consommation régulière de vin rouge par la population française. Le lien entre les concentrations de resvératrol dans le vin rouge et ses effets sur la santé a rapidement été décrit (Jeandet *et al.*, 1995b,c ; Stervbo *et al.*, 2007). L'engouement suscité par cette molécule a permis une multiplication importante des travaux portant sur ses propriétés biologiques, confirmant son potentiel pour la protection des animaux face à de nombreuses maladies (Kopp, 1998). Après deux décennies d'étude, le resvératrol a montré une action de prévention et de lutte contre le cancer, de protection contre les maladies neurodégénératives, mais aussi une induction des gènes des Sirtuines qui lui procureraient un rôle sur le diabète et sur l'allongement de la vie des organismes à vie courte, comme les levures et les drosophiles.



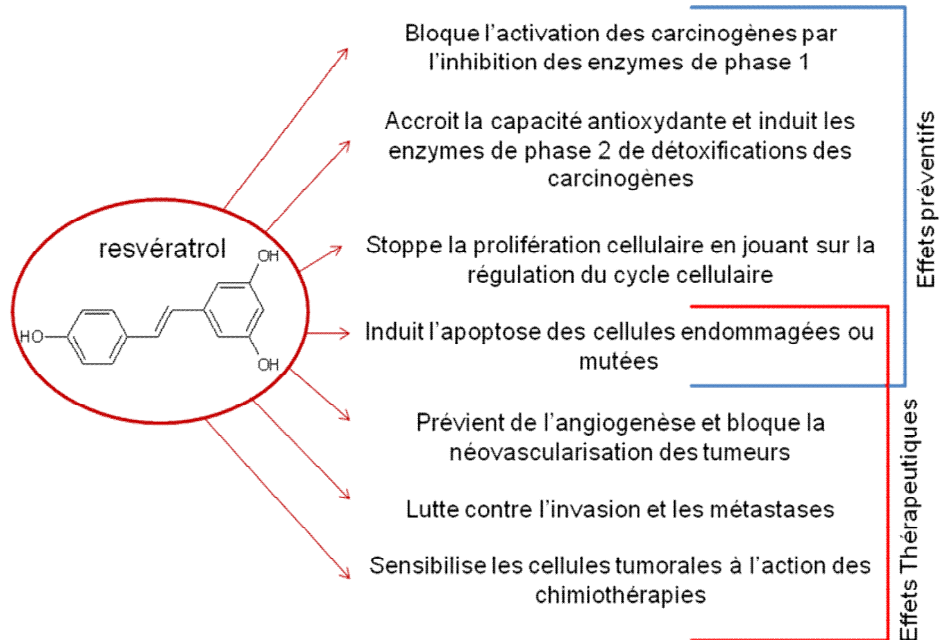


Figure 8 : Actions du resvératrol sur le cancer, effets préventifs et effets thérapeutiques (d'après Kundu et Surh, 2008)

i. Effet de protection du système cardiovasculaire

Les études ayant permis d'illustrer le « French paradox » ont montré que la consommation de vin rouge diminue les risques de maladies cardiovasculaires malgré un régime alimentaire enrichi en lipides. Le resvératrol, dont la présence a été caractérisée dans le vin rouge, agirait comme régulateur des molécules inductrices de l'agrégation plaquettaire, évitant ainsi une activation non justifiée de ce mécanisme et donc l'obturation des vaisseaux sanguins. Le resvératrol possède aussi une propriété de vasodilatation des artères et serait aussi capable d'inhiber l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein), permettant ainsi de prévenir la formation de plaque d'athérome (Frankel *et al.*, 1993).

ii. Effet sur le cancer

Le resvératrol agit sur la carcinogénèse en présentant des actions au niveau des trois stades de ce processus : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression. De plus, le resvératrol supprime les phases finales de la carcinogénèse telles que l'angiogénèse et les métastases (Delmas *et al.*, 2006). Le resvératrol joue un double rôle car il peut prévenir de la formation de cancers mais permet aussi de lutter contre un cancer déjà déclaré (Figure 8) (Kundu et Surh, 2008). A faible dose, le resvératrol a la propriété de potentialiser l'effet des chimiothérapies traditionnelles (Delmas *et al.*, 2006). Ces propriétés ont été décrites *in vitro* mais elles ont été confirmées *in vivo* chez l'animal. Des études cliniques pour évaluer le réel potentiel du resvératrol en médecine sont en cours (Kundu et Surh, 2008).

iii. Effet sur les maladies neurodégénératives

Plusieurs études ont montré que la consommation modérée de vin rouge est à l'origine d'une diminution de l'incidence de la maladie d'Alzheimer et le resvératrol pourrait à nouveau être impliqué dans cette observation. Par son action anti-oxydante, ce composé pourrait bloquer les formes activées de l'oxygène synthétisées dans les neurones sous l'action de peptide amyloïde β . Ce peptide ainsi que les formes activées de l'oxygène sont à l'origine de l'apoptose de nombreux types cellulaires. Le resvératrol est capable d'inhiber celle-ci en



agissant sur le substrat des caspases-3 (Rocha-González *et al.*, 2008). Le resvératrol serait aussi capable de réguler des facteurs jouant sur la fluidité de la transcription synaptique impliquée dans l'apprentissage et la mémoire, au travers de l'induction de certaines MAPK. Un autre effet supposé du resvératrol serait de jouer sur la concentration en peptide amyloïde β , mais aucune action contre les enzymes identifiées actuellement comme participant à la synthèse ou à la dégradation de ce peptide n'a pu être montrée. Il semblerait que le peptide amyloïde β inhiberait le protéasome, inhibant ainsi sa propre dégradation. Le rôle du resvératrol serait alors identifié dans l'activation de ce complexe protéique, avec comme conséquence la dégradation du peptide. De plus la propriété d'induction des gènes SIRT1 attribuée au resvératrol, mais nuancée récemment, permettrait d'inhiber l'action NF- κ B induit par le peptide amyloïde β (Ramassamy, 2006 ; Rocha-González *et al.*, 2008).

Dans le cas de la maladie de Parkinson, la dégénérescence de neurones dopaminergiques est en cause et engendre la formation de corps de Lowry. Ici des faibles doses de resvératrol inhiberaient la mort cellulaire provoquée par la dopamine, par des actions l'induction de facteurs anti-apoptotiques et une inhibition des caspases 3. Son action anti-oxydante pourrait là encore jouer sur les formes réactives de l'oxygène qui interviennent dans les mécanismes de la maladie (Rocha-González *et al.*, 2008).

Les propriétés du resvératrol en termes de protection du système nerveux central sont de plus en plus étudiées et des résultats bénéfiques seraient obtenus contre l'épilepsie, la maladie d'Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Jin *et al.*, 2008). Son activité permettrait aussi de prévenir la détérioration des neurones et pourrait limiter les migraines (Jin *et al.*, 2008). Ces résultats prometteurs ont été obtenus par des tests *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal. L'application dans le cadre de la médecine humaine n'est pas encore une réalité. De nombreuses étapes restent à franchir pour voir le resvératrol utilisé dans le traitement de patients atteints de ces maladies. Toutefois, des demandes de volontaires ont été réalisées pour se soumettre à des tests cliniques de phase 3 pour tester le resvératrol contre la maladie d'Alzheimer (<http://clinicaltrials.gov>).



iv. Effet sur le diabète

Le resvératrol favorise la respiration cellulaire et améliore ainsi les capacités de l'organisme à augmenter la consommation d'oxygène au niveau des fibres musculaires, induisant une meilleure élimination des graisses. Le resvératrol est capable par l'induction de l'expression des gènes codant pour les *Sirtuines* d'accroître la sensibilité des souris et des rats à l'insuline, de diminuer la glycémie et d'augmenter la capacité mitochondriale, ce qui permet d'atténuer la résistance à l'insuline et de réduire les effets des régimes hypercaloriques *in vivo*. Cet effet est notamment visible chez les souris devenues obèses suite à une anomalie génétique ou à cause d'un régime alimentaire hypercalorique. Le resvératrol bloque aussi les effets néfastes du diabète sur l'organisme. En protégeant les hépatocytes du stockage lipidique lorsqu'ils sont soumis à une glycémie élevée, il prévient de l'hyperlipidémie et du développement de lésions aortiques (Pillarisetti, 2008). Son activité limite aussi les risques d'infarctus du myocarde, de dégénérescences des neurones et de déficience rénale, qui peuvent être imputés au fort taux de glucose sanguin (Pillarisetti, 2008).

v. Effet antiviral

Le resvératrol pourrait par son action anti-oxydante limiter la réplication des virus. En effet, les cycles cellulaires de certains virus sont décrits comme étant influencés par l'état d'oxydoréduction de l'hôte (Palamara *et al.*, 2005). Toutefois, le resvératrol agit par un autre mécanisme d'inhibition de la réplication des virus. Contre le virus de la grippe A, par exemple, il est impliqué dans le blocage de la translocation noyau/cytoplasme des ribonucléoprotéines du virus, induisant une réduction de l'expression des protéines virales en relation avec l'activité des protéines kinase C. Il permet d'augmenter la survie des cellules pulmonaires en inhibant la réplication du virus, diminuant de 87% le nombre de virus après 24 h, dans les cellules pulmonaires des souris atteintes de la grippe (Palamara *et al.*, 2005). Une action positive du resvératrol a été décrite sur des maladies virales fréquentes telles que l'herpès (Faith *et al.*, 2006) ou la varicelle/zona (Docherty *et al.*, 2006). Un effet du resvératrol sur le virus du HIV a été décrit et un travail récent démontre, ici encore, l'implication de l'induction des *Sirtuines* (Zhang *et al.*, 2009).



vi. Effet sur l'espérance de vie

Un effet très médiatisé du resvératrol est celui de l'allongement de l'espérance de vie. De nombreux travaux ont été réalisés sur ce sujet avec des résultats prometteurs. L'induction de l'expression du gène codant des *Sirtuines* serait en cause (Wood *et al.*, 2004). Les *Sirtuines* agiraient en mimant une restriction calorique (Bordone et Guarente, 2005). L'allongement de l'espérance de vie suite à un traitement au resvératrol a d'ores et déjà été mis en évidence sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Howitz *et al.*, 2003) et chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* (Bauer *et al.*, 2004). Plus récemment cet effet a été observé chez les vertébrés à durée de vie courte et, en particulier, chez la souris (Baur *et al.*, 2006 ; Valenzano *et al.*, 2006 ; Pearson *et al.*, 2008 ; Barger *et al.*, 2008). Le resvératrol pourrait non seulement accroître l'espérance de vie mais surtout aurait comme conséquence de retarder les effets du vieillissement (Baur et Sinclair, 2008).

vii. Effet sur la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie génétique fréquente en Afrique. Cette maladie affecte l'intégrité de la structure de la molécule d'hémoglobine par une mutation, entraînant le remplacement d'un acide glutamique par une valine. Cette mutation entraîne une forme anormale des hématies qui prennent alors une forme de faux, d'où le nom d'anémie falciforme. Ces hématies perdent la capacité de transport de l'oxygène et augmentent les risques d'obturation des vaisseaux sanguins. La molécule utilisée dans le traitement de cette maladie est l'hydroxyurée. Cette molécule induit la synthèse d'hémoglobine fœtale chez le patient traité et permet donc de diminuer les effets de la maladie, mais elle présente une toxicité pour différents tissus de l'organisme (Lanzkron *et al.*, 2008). Des molécules d'origine naturelle ont alors été recherchées comme source potentielle de nouveaux traitements. Le resvératrol a montré qu'il pouvait mimer l'effet de l'hydroxyurée à différents niveaux (Rodrigue *et al.*, 2001 ; Bianchi *et al.*, 2009).



V. L'utilisation actuelle du resvératrol

i. L'utilisation cosmétique

Compte tenu de ses nombreuses propriétés, le resvératrol pourrait devenir dans quelques années une molécule incontournable en pharmaceutique si elle obtient les autorisations de mise sur le marché pour ses applications médicales. A l'heure actuelle, ce composé est utilisé essentiellement comme compléments alimentaires et en cosmétique. Fort de sa réputation liée au « French paradox », le resvératrol s'est imposé à l'échelle marketing comme produit naturel de la vigne. En France notamment, plusieurs entreprises commercialisent des produits cosmétiques à base de resvératrol issu de l'extraction de sarments de vigne. C'est le cas de Dior, pour le groupe LVMH, ou de Caudalie. Des brevets sur l'extraction et la stabilisation du resvératrol ont été déposés par ces entreprises (Vercauteren *et al.*, 2006 (Caudalie) ; Andre et Renimel, 2007 (LVMH Recherche)). D'autres firmes dans le monde utilisent aussi du resvératrol dans leurs produits, comme l'entreprise américaine Estée Lauder. L'extraction du resvératrol des sarments de vigne pourrait fournir un atout en terme de valorisation des déchets agricoles, car les bois de taille considérés comme des déchets et souvent brûlés, pourraient fournir le resvératrol, molécule à haute valeur ajoutée (Rayne *et al.*, 2008). La limite posée à l'utilisation des bois de taille est l'extraction du resvératrol car elle est énergivore et nécessite l'emploi de grandes quantités de solvants (Andre et Renimel, 2007). Cette extraction est donc en inadéquation avec le développement durable (Donnez *et al.*, 2009).

ii. L'utilisation en tant que compléments alimentaires

Dans l'utilisation comme compléments alimentaires, même si la démarche commerciale est, elle aussi, basée sur le « French Paradox » et la vigne, le resvératrol utilisé provient d'une autre plante, connu pour sa synthèse de stilbènes, la renouée du Japon (*Fallopia Japonica* ou *Polygonum cuspidatum*) (Beerling *et al.*, 1994). Cette plante accumule principalement de la polydatine et du picéide qui sont deux dérivés glycosylés du resvératrol. Selon certains travaux, l'extraction de resvératrol et de picéides à partir d'un extrait sec de



racines de la renouée est possible en quelques étapes (Chu *et al.*, 2005) mais le resvératrol n'est présent qu'en faible quantité allant de 0,1 à 0,2% de la matière sèche (Zhao *et al.*, 2005a). La majeure partie des stilbènes est présente sous forme de glycosides qu'il est nécessaire d'hydrolyser pour obtenir la forme aglycone. Pour cela, une digestion enzymatique par des β -glucosidases est réalisable (Waterhouse *et al.*, 1994) mais à l'échelle industrielle, l'hydrolyse enzymatique est coûteuse et difficile à mettre en place. L'hydrolyse alcaline est donc actuellement utilisée mais elle est soumise à la controverse de la politique écologique car elle est responsable de la production de nombreux sous-produits polluants. Une alternative intéressante pourrait donc être la digestion par des microorganismes (Tian *et al.*, 2008).

Actuellement, la renouée du Japon représente tout de même la principale source de resvératrol. Cette production est majoritairement originaire de Chine. La culture, en dehors de l'Asie, de cette plante n'apparaît pas réalisable. En effet elle a été exportée au 19^{ème} siècle pour le fourrage et l'ornement, mais elle est vite devenue envahissante et a provoqué la disparition d'espèces endémiques aux lieux d'introduction (<http://www.invasivespecies.net>).

VI. Biotechnologie végétale et microbienne : source de molécules d'intérêt

Pour produire des molécules naturelles d'intérêt, issues notamment des plantes, l'utilisation des biotechnologies est devenue une excellente alternative permettant de contourner les problèmes engendrés par la synthèse chimique ou l'extraction *in planta*. En effet, la synthèse chimique représente une méthode intéressante dans le cas de molécules simples. Pour les molécules à la structure plus complexe, le recours à la chimie s'avère difficile et très onéreux. L'extraction végétale apparaît alors comme une technique intéressante, à condition que la plante puisse être cultivée facilement et fournir de la biomasse en quantité suffisante. Cependant, les plantes accumulent rarement des métabolites secondaires en grande quantité. Le cas d'extraction à partir de parties pérennes de ligneux illustre bien cette limite. Un abattage de l'arbre est obligatoire mais son remplacement comme source de production ne sera obtenu qu'après plusieurs années (Wu et Chapell, 2008). Ces problèmes se cumulent avec celui de l'extraction de la molécule d'intérêt. En effet, chez les plantes, une grande variété de composés est présente et il est donc difficile de purifier une molécule en quelques étapes. Les méthodes d'extraction sont énergivores et nécessitent une grande quantité de solvants en opposition avec la politique actuelle de protection de l'environnement (André et Renimelle, 2007). Ceci est d'autant plus vrai que les différentes



étapes sont très rarement effectuées sur le même site géographique, nécessitant un transport coûteux et polluant.

Les biotechnologies pourraient donc représenter une alternative intéressante à ces problèmes et deux approches sont actuellement particulièrement étudiées. L'utilisation de microorganismes modifiés génétiquement est une technique qui est couramment utilisée pour produire de nombreuses molécules. Bien que ceux-ci soient incapables de réaliser la synthèse de ces composés d'origine végétale à l'état naturel, il est possible de les transformer en y insérant les gènes de plante nécessaires à cette synthèse. Le recours à l'emploi de suspensions cellulaires végétales est une autre possibilité. Ce système *in vitro* offre une culture et une production en milieu contrôlé de la même manière que les microorganismes. Les avantages sont (i) la limitation de l'introduction de précurseurs car les cellules végétales réalisent la synthèse entière du composé et (ii) l'utilisation de cultures non-OGMs.

i. Emploi des microorganismes

Les bactéries sont des systèmes permettant d'obtenir très rapidement une biomasse importante. De plus il est possible de les congeler ou de les lyophiliser pour les conserver (Swift, 1920). Leur emploi en production peut donc s'appuyer sur ces propriétés intéressantes. L'utilisation de microorganismes pour la production de molécules d'intérêts existe à l'échelle industrielle où les bactéries représentent des systèmes bien connus. La culture de bactéries est réalisée à des volumes de plusieurs centaines de milliers de litre au niveau industriel. Cependant, leurs métabolismes montrent certaines limites comme l'absence de réactions de glycosylation et du mécanisme d'épissage, qui sont des fonctions qui n'existent que chez les eucaryotes. Les levures (champignons) sont également utiles dans les domaines où les bactéries ne sont pas compétentes. Les levures sont principalement connues en fermentation pour la production d'alcool (vin et bière notamment) mais aussi dans la réalisation du pain ou des hormones de croissance. Les levures sont aussi transformables génétiquement, ce qui permet de leur faire exprimer des gènes d'intérêts qu'elles ne possèdent pas naturellement (Romanos *et al.*, 1992).



ii. Emploi de cultures cellulaires végétales

1. Historique

Le pionnier dans le domaine de la culture cellulaire végétale est Gottlieb Haberlandt. Il réalisa des travaux sur la possibilité de cultiver une cellule végétale isolée et en 1902, il exposa sa théorie à l'Académie Allemande des Sciences. Son travail consista à rechercher les propriétés de la cellule végétale en tant qu'organisme élémentaire, ainsi que les relations et interactions existantes entre cellules dans un organisme pluricellulaire. Il définit aussi clairement le principe de la totipotence végétale et son implication dans sa théorie. La mise en pratique de ses découvertes se fit bien des années plus tard avec les premières cultures de tissu de racine de tomate dans un milieu défini (White, 1934). A cette période, furent développés les premiers milieux de culture avec l'ajout d'auxine et de vitamines dans les milieux gélifiés.

La période s'étalant des années 1940 aux années 1960 a connu l'avènement des biotechnologies végétales et une forte avancée des techniques, liées à l'utilisation du lait de coco qui s'avéra être riche en acides aminés et en cytokinines. L'obtention de cals de nombreuses espèces fut possible et de nombreux milieux encore utilisés actuellement firent leur apparition à cette époque. Les travaux portant sur l'ajout d'acides aminés permirent la découverte de la première cytokinine, la zéatine. Le jeu sur la balance hormonale est alors devenu possible, en faisant varier le rapport cytokinine/auxine apportés de manière exogène, ce qui permit d'augmenter le nombre d'espèces cultivées sous forme de cals. Les premières cultures de cellules isolées furent obtenues par agitation de cals dans un milieu liquide et par filtration sur du papier filtre (Thorpe, 2007 ; Georgiev *et al.*, 2009). Toutefois, les suspensions cellulaires en milieu liquide firent l'objet d'une description précise pour la première fois dans le brevet déposé par l'entreprise Pfizer & Co, en 1956, sur l'obtention de suspensions cellulaires végétales à partir de différents types d'explants et de différentes espèces. La biomasse obtenue était séchée et son extraction permit l'obtention de métabolites secondaires (Routien et Nickel, 1956). Le passage de la culture en plus grand volume a été réalisé en 1959 dans des bonbonnes où un apport d'air était réalisé. Ces cultures cellulaires de ginkgo, de houx, de rose et d'ivraie ont démontré la possibilité d'obtenir à partir de ces systèmes un accroissement de la biomasse végétale (Thorpe, 2007). Dans les années 1980, l'optimisation des cultures de suspensions cellulaires végétales a permis un transfert à grande échelle. Les cultures pour obtenir de la shikonine, la catharanthine, le ginseng et le paclitaxel ont été



réalisées dans des bioréacteurs allant de quelques centaines de litres jusqu'à 75000 litres (Vasil, 2008).

2. Caractéristiques et utilisations de la culture végétale

a. Présentation générale

L'utilisation de cultures de cals et de suspensions cellulaires permet non seulement d'envisager une bioproduction de molécules d'intérêts d'origine végétale, mais aussi d'obtenir des connaissances fondamentales importantes sur de nombreux mécanismes cellulaires. Ces modèles simplifiés sont largement décrits comme pouvant être élicités, permettant ainsi l'étude de la mise en place de réponses métaboliques et génétiques précoces ou tardives à l'échelle cellulaire.

L'avantage représenté par les suspensions cellulaires est le contrôle des conditions de culture. Il est en effet possible de modifier le milieu de culture en jouant sur sa composition mais il est aussi envisageable de modifier les conditions physiques de la culture.

b. Variation des paramètres de culture

Les paramètres de culture à mettre en œuvre sont différents d'une culture et d'une espèce à l'autre. Cependant des constantes existent, les milieux de culture étant généralement issus des premiers milieux décrits pour la culture végétale comme celui de Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962), par exemple. Ces milieux sont en général modifiés au niveau de la balance phytohormonale mais rarement au niveau des macro- et micro-éléments.

Le rapport de concentrations des régulateurs de croissance peut avoir des conséquences directes sur le maintien de la culture. En effet, cet équilibre permet de maintenir les cellules sous forme indifférenciée et, dans d'autres cas, permet l'induction de différenciation aboutissant à la régénération d'organes et d'organismes. Dans une moindre mesure, cet équilibre joue un rôle sur la synthèse de métabolites secondaires. Ceci a été observé (i) avec des cultures de *Catharanthus roseus*, où le 2,4D s'est avéré être un inhibiteur de la biosynthèse des alcaloïdes indoliques (Decendit *et al.*, 1992), (ii) avec des suspensions



cellulaires de *Fagaria zanthoxyloides* où l'ANA et la BAP jouaient un rôle antagoniste de la production de furoquinolines (Couillerot *et al.*, 1996) et (iii) sur des cals de *Vitis thunbergii* cv. Sieb. et Zucc. pour la production de resvératrol (Ho et Kuo, 2008).

La source carbonée est un facteur à prendre en considération car elle est nécessaire au maintien et à la croissance des cellules mais aussi à la production des métabolites. L'apport de glucides est d'autant plus nécessaire dans le cas d'une culture à l'obscurité où l'hétérotrophie est totale. Une variation de la quantité de sucre peut générer des phénomènes de stress osmotique au niveau des cellules (Wang *et al.*, 1999), pouvant conduire à une inhibition de la croissance ou à la production de métabolites secondaires. Cela a été mis en évidence au niveau de la production de resvératrol par des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* cv. Gamay Fréaux var. Teinturier (Belhadj *et al.*, 2008).

En plus de la constitution des milieux de culture, les paramètres physiques peuvent s'avérer décisifs, en particulier lors du passage vers des volumes importants de culture. Généralement, les suspensions cellulaires végétales sont cultivées en fioles d'Erlenmeyer où le volume de la suspension est ajusté en fonction de la taille de la fiole pour obtenir un brassage optimal. La vitesse d'agitation du plateau orbital sur lequel sont disposées les fioles est ensuite réglée de manière à favoriser une bonne croissance des cellules. Cette technique permet de limiter les stress mécanique et oxydatif. Cependant pour réaliser un transfert en volume plus important, la culture est réalisée en bioréacteurs dont différents types existent (Eibl et Eibl, 2008). En fonction de la forme de la cuve et du mécanisme d'agitation et d'oxygénation, deux facteurs deviennent importants. Une agitation mécanique trop intense peut endommager les cellules végétales car elles sont sensibles aux forces de cisaillement à cause de leur taille relativement grande et de leur paroi fine (Kieran *et al.*, 1997). L'autre facteur essentiel est l'aération apportée sous forme du bullage d'air ou d'un mélange de gaz (air, O₂, CO₂) dans le milieu de culture. L'apport d'oxygène dans le milieu peut induire un stress oxydatif au niveau des cellules et risque aussi d'induire une oxydation des métabolites secondaires. D'une manière générale, l'aération et l'agitation sont deux paramètres complémentaires qui aboutissent au brassage et à l'oxygénation de la suspension. Toutefois, les effets cumulés et potentiellement stressants de ces deux paramètres ne doivent pas être limitant (Georgiev *et al.*, 2009). Le choix du type de bioréacteur et des conditions de culture est à considérer en fonction de la résistance des cellules à ces deux paramètres (Eibl et Eibl, 2008). La culture à l'obscurité est à privilégier dans le cas de transfert des cellules en bioréacteur de grand volume.



c. Induction de la synthèse des métabolites

A l'échelle de la recherche ou de l'industrie, le niveau basal de métabolites que synthétisent les suspensions cellulaires végétales est souvent insuffisant (Wu et Chapell, 2008). Diverses techniques existent afin d'induire une augmentation de leur production. Ainsi une culture en deux temps, avec le développement d'un milieu de croissance cellulaire et d'un milieu d'induction de la synthèse des métabolites peut être envisagée. Cette approche est celle qui a été choisie pour la production de shikonine par des cultures de *Lithospermum erythrorhizon*, premier exemple de production d'un métabolite végétal à l'échelle industrielle. Un premier milieu est utilisé pour la multiplication de la biomasse. Lorsque celle-ci est suffisamment importante, le transfert sur un milieu d'induction permet d'obtenir la synthèse de la molécule d'intérêt (Tabata, 1988). Les différences entre les milieux de croissance et d'induction sont basées sur la balance phytohormonale ou la variation de l'apport de la source carbonée.

Pour promouvoir la synthèse des métabolites secondaires d'intérêt, il est aussi possible d'envisager d'apporter leurs précurseurs. Dans le cas du resvératrol, l'apport dans le milieu de la phénylalanine a donné des résultats encourageants. Cette stratégie permet d'augmenter la quantité de resvératrol produite (Krisa *et al.*, 1999).

Dans le cas de métabolites secondaires impliqués dans la défense, la stratégie la plus fréquente consiste à mimer l'action des pathogènes et ainsi d'induire les mécanismes conduisant à la synthèse des phytoalexines. L'élicitation a permis d'obtenir des résultats avec de nombreuses espèces et métabolites différents (Mulabagal et Tsay, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005). Les molécules signal, tel que le MeJA ou le SA, présentent un intérêt important pour stimuler la production. Cependant, comme leur spectre d'action est large, elles peuvent provoquer des effets secondaires. Dans le cas du MeJA, une inhibition de la croissance accompagne l'induction des métabolites (Ferri *et al.*, 2009 ; Donnez *et al.* 2010). L'utilisation d'éliciteurs généraux peut alors devenir une stratégie intéressante. Ces molécules permettent une induction importante des mécanismes de défense et en particulier des phytoalexines qui s'accumulent alors au niveau cellulaire ou extra-cellulaire. D'autres molécules organiques, comme le chitosan, induisent elles aussi des augmentations de la production des métabolites secondaires intéressante (Ferri *et al.*, 2011). L'exemple de molécules telles que les cyclodextrines montrent là encore un potentiel d'élicitation important conduisant à une synthèse accrue des métabolites (Bru et Pedreno, 2006 ; Donnez *et al.*, 2009). Dans ce cas, un



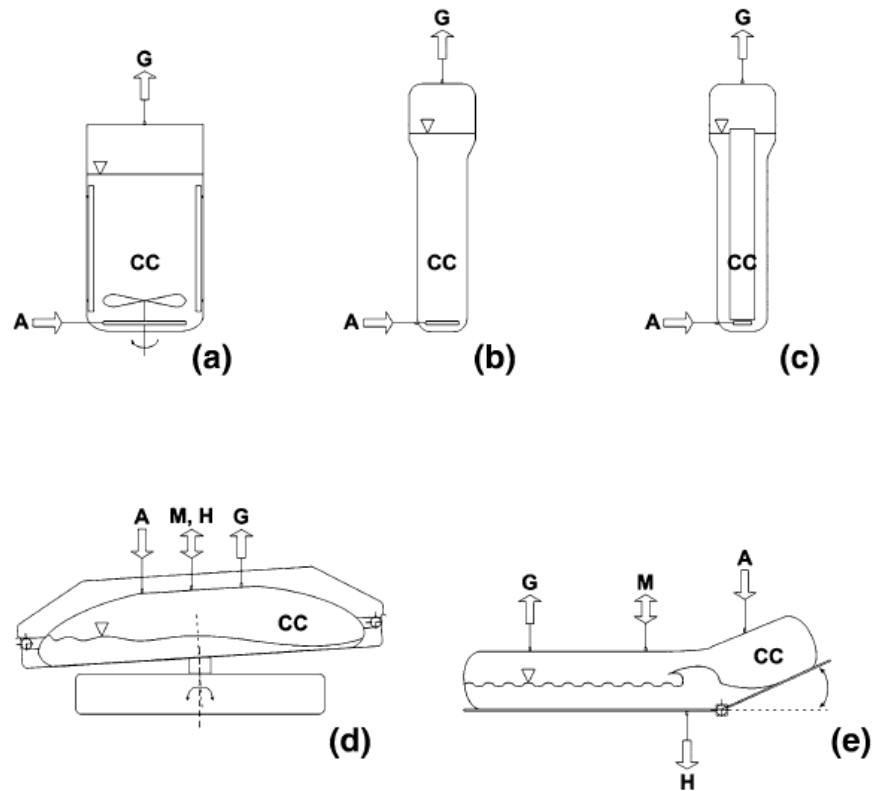


Figure 9 : Représentation schématique de différents types de bioréacteur utilisable pour la culture cellulaire végétale. (a) bioréacteur agité, (b) bioréacteur à colonne à bulle, (c) bioréacteur airlift, (d) bioréacteur à vague (Biowave), (e) bioréacteur à vague et à contre courant (Wave & Undertow Bioreactor). Légende : A = apport de gaz, G = sortie de gaz, CC = compartiment de culture, M = ajustement du milieu, H = prélèvement. D'après Eibl et Eibl, 2008.

rôle de protection des métabolites, à l'intérieur de leur structure, leur est aussi attribué. Les différents traitements réalisés sur des suspensions cellulaires de vigne et la variation de la production de resvératrol représentent un exemple pertinent pour décrire la variété des éliciteurs qui peuvent être employés ainsi que leurs effets (voir article 1).

d. Les différents systèmes de culture

La fiole d'Erlenmeyer représente le système le plus simple dans le cas de la culture d'une suspension cellulaire. Ainsi des fioles de différents volumes depuis 50 mL jusqu'à 5 L sont classiquement utilisées avec respectivement de 20 mL à 2 L de volume de suspension cellulaire. L'agitation et l'oxygénation sont alors réalisées par l'utilisation d'un agitateur orbital rotatif avec des vitesses variables en fonction du volume de culture et des besoins de la suspension.

Parmi les différents types de bioréacteurs (Figure 9), le plus classiquement utilisé est le bioréacteur agité. Celui-ci est muni d'une arrivée d'air et d'une ou plusieurs pales d'agitation. La taille et le « design » de la pale sont très importants et conditionnent le stress mécanique, ainsi que le risque de cisaillement des cellules. La pale de type Rushton, très utilisée en microbiologie, est généralement à proscrire pour la culture végétale. Bien que celle-ci offre une agitation efficace, elle augmente considérablement le risque de cisaillement. De ce fait, une pale Pitched Blade ou une hélice marine sont alors mieux adaptées. Le choix de la configuration ascendante ou descendante de la pale est déterminant afin de limiter l'accumulation de cellules soit au fond de la cuve soit en surface sur les parois de la cuve (Mirro et Voll, 2009). Dans le bioréacteur agité, le brassage est la résultante de l'agitation et du bullage. Par opposition, le bioréacteur airlift ne possède pas de pale, le brassage est obtenu par la configuration en colonne haute et étroite où est réalisé un bullage continu et assez important. Ce type de bioréacteur conviendra à des cellules sensibles au cisaillement mais résistantes à l'oxygénation. D'autres systèmes moins courants existent comme les bioréacteurs Biowave où la culture est réalisée dans une chambre en plastique stérile à usage unique placé sur un plateau d'agitation (Eibl *et al.*, 2009). Ce système permet de reproduire la culture réalisée en fioles d'Erlenmeyer mais nécessite une surface de culture importante et présente un scale-up limité compte-tenu du mécanisme d'agitation, même si des volumes jusqu'à 2000 L sont actuellement utilisés (Eibl *et al.*, 2010).



Si les cellules sont trop sensibles, leur culture peut être réalisée de manière immobilisée, soit par un emprisonnement dans des billes d'alginate de calcium (Charlet *et al.*, 2000) ou par un blocage dans une matrice (Vyas et Cino, 2007). Ces systèmes sont particulièrement utilisés dans le cas où les cellules produisent de manière constitutive le composé d'intérêt et que celui-ci est excrété, comme dans le cas de la production de saponine spirostanol par des suspensions cellulaires de *Solanum chrysotrichum* (Charlet *et al.*, 2000).

e. Utilisation des suspensions cellulaires

Les suspensions cellulaires permettent la bioproduction de métabolites, mais leur utilisation ne se limite pas à ce champ d'investigation. Ces cultures présentent un intérêt majeur dans l'étude de mécanismes au niveau fondamental. Même si les cellules qui composent les suspensions, par leur nature dédifférenciée, n'ont pas leur équivalent au niveau de la plante entière, ce système reste un excellent modèle afin de comprendre à l'échelle cellulaire des mécanismes complexes. Le travail sur suspension de *Rauvolfia canescens* a, par exemple, montré que lors de l'élicitation par un extrait de paroi de levure, une accumulation temporaire d'acide jasmonique était obtenue, permettant de montrer que cette molécule était un messenger impliqué dans l'induction de la synthèse des benzophénanthridines (Gundlarch *et al.*, 1992). Le système cellulaire est également très utile pour purifier des enzymes afin d'étudier leurs caractéristiques, comme cela a été montré avec la STS qui a pu être purifiée à partir de suspensions cellulaires d'arachide (Schöppner et Kindl, 1984).

VII. La biotechnologie comme source de resvératrol ?

Ainsi, les propriétés intéressantes des systèmes microbiens et végétaux ouvrent de nouvelles perspectives de production du resvératrol. Cette molécule pourrait alors connaître un développement commercial par biotechnologie en adéquation avec le développement durable en s'affranchissant des procédés d'extraction actuels. De plus, si les études cliniques qui se déroulent actuellement chez l'homme viennent à démontrer que les propriétés *in vitro* et chez l'animal peuvent être appliquées en médecine, la demande en resvératrol pur risque de s'accroître. Les travaux menés sur la production de resvératrol par les différents systèmes de production biotechnologique ont fait l'objet d'un article de revue.



Publication 1 : Bioproduction of resveratrol and stilbenes derivatives by plant cells and microorganisms.



Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms

David Donnez¹, Philippe Jeandet², Christophe Clément¹ and Eric Courot¹

¹Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche "Vigne et Vins de Champagne–Stress et Environnement", EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 02, France

²Laboratoire d'Oenologie et de Chimie Appliquée, Unité de Recherche "Vigne et Vins de Champagne–Stress et Environnement", EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 02, France

***Trans*-resveratrol is a phenolic plant compound that has been recognized for its benefits on human health. Currently, increasing demand for *trans*-resveratrol for nutraceutical, cosmetic, and putatively pharmaceutical uses makes its production from sustainable sourcing a necessity. In this context, the use of biotechnology through recombinant microorganisms and plant cell suspensions is particularly promising because it represents a reliable alternative method of *trans*-resveratrol production under controlled conditions. Tailoring yeast or bacteria with genes that encode enzymes of the *trans*-resveratrol pathway and further elicitation of plant-cell metabolism might represent powerful strategies for increased *trans*-resveratrol bioproduction. This review aims at describing and comparing these different available methods, with a focus on their respective advantages, limits and perspectives as a basis for scale-up in large culture volumes.**

Introduction

The polyphenol *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene), a member of the stilbene family, recently has become the focus of a number of studies in medicine and plant physiology, and has emerged as a promising molecule that potentially affects human health. It was first isolated from white hellebore (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) [1] and was also found in Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum* syn. *Fallopia japonica*) [2]. In grapevine *trans*-resveratrol shows antifungal activity [3,4], whereas in leaves and berries, it is a phytoalexin that is produced in response to stresses, such as wounding or pathogen attack [5]. In wood, *trans*-resveratrol is produced constitutively and acts as a phytoanticipin [6]. *Trans*-resveratrol has been associated with the "French paradox" because its daily consumption, for example, in the form of red wine [7–9], has been attributed with beneficial effects [10] and protection against coronary diseases [11]. Other foods might also represent valuable sources of *trans*-resveratrol, such as Itadori tea, peanut butter or chocolate [12,13]. In addition, some plants have

been modified genetically in order to produce *trans*-resveratrol for the assessment of its potential role in health promotion and plant disease control, such as in tobacco or tomato [14,15]. As a result of its antioxidant properties, it has been suggested that *trans*-resveratrol plays a role in the prevention of cardiovascular diseases [16] and might also provide some protection against certain types of cancer [17,18]. Moreover, *trans*-resveratrol appears to protect against diabetes [19] and neurodegenerative diseases [20], through its induction of *Sirtuin-1* genes. *Trans*-resveratrol might also contribute to extending lifespan in metazoans and mice by acting as a mimic agent of the caloric restriction effect and thus decreasing age-related signs [21–24]. However, stilbene assimilation and its metabolism could be problematic in animals [25], although some research has shown that *trans*-resveratrol is active even when it is supplied in drinking water [26].

Regardless of these potential limitations, the interest for *trans*-resveratrol is constantly increasing, based on its presumed biological properties, and some clinical trials are currently underway to better characterize its role in protection against cancer, diabetes, and degenerative diseases. *Trans*-resveratrol currently is produced mainly by field cultures of *P. cuspidatum* (*F. japonica*). China is the main *trans*-resveratrol producer from *Polygonum* root extracts, with different degrees of purity. Nowadays, the main market for *trans*-resveratrol is in nutraceuticals. Here, the demand for *trans*-resveratrol from grapevine, in relation to the French paradox, might further increase rapidly, and new sources might soon become a necessity. In the cosmetics field, *trans*-resveratrol is used widely, and grapevine might be the most suitable raw material for obtaining *trans*-resveratrol and its derivatives for products such as face creams [27,28].

The use of biotechnology might represent a powerful means for large-scale production of *trans*-resveratrol because the use of microorganisms or plants allows for low cost and rapid production of biologically active molecules in large amounts. In this review, we will focus on presenting the current state of the art of *trans*-resveratrol

Corresponding author: Clément, C. (christophe.clement@univ-reims.fr).



bioproduction and also highlight the relative advantages and disadvantages of microorganism-based systems and plant cell cultures.

Bioproduction of *trans*-resveratrol in microorganisms

Microorganisms are widely used biological systems for the production of numerous valuable molecules [29]. Engineering bacteria or yeasts for *trans*-resveratrol production might thus represent a valuable means for its production in large quantities. Their tailoring is necessary because they do not possess the genes that encode for the *trans*-resveratrol pathway. Two strategies have been investigated to that end: (i) introducing the entire pathway using aromatic amino acids as substrates (L-phenylalanine or L-tyrosine); and (ii) introducing specific genes, such as *coumaroyl-CoA ligase* and *stilbene synthase*, and using 4-coumarate as a starting block (Fig. 1).

Pathway engineering

To obtain *trans*-resveratrol from the precursors L-phenylalanine or L-tyrosine appears to be the most promising option in terms of production cost. Transformation of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* (ATCC 20362 strain) with the genes that encode for the phenylpropanoid pathway, including stilbene synthase, can be performed successfully. The resulting yeast is able to express enzymes that provide phenylalanine/tyrosine ammonia lyase (PAL/TAL) (EC 4.3.1.5/EC 4.3.1), cinnamate-4-hydroxylase (EC 1.14.13.11), coumaroyl-CoA ligase (4CL) (EC 6.2.1.12), and stilbene synthase (STS) (EC 2.3.1.95) activities. Metabolic engineering is completed by constitutive expression of malonyl-CoA, a precursor for both flavonoid and stilbene synthesis. Genes that encode for each required enzyme from different plant species (grapevine, peanuts) have been tested. In the best performing yeast, genes that encode for the PAL and TAL from *Rhodotorula glutinis*, the 4CL from *Streptomyces coelicolor*, and an STS from *Vitis* sp. have been used, and the resulting production of *trans*-resveratrol has reached 1.46 mg/l [30]. The entire *trans*-resveratrol pathway has been introduced in other microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae* (CEN.PK113-5D strain), *Lactococcus lactis* (FSAO-VST strain), *Aspergillus niger* (FGSC A913 strain) and *Aspergillus oryzae* (MG1363 strain). In these cases, pathway expression started with the PAL enzyme, whereas in *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain, the TAL enzyme was first introduced. The ability of tailored *S. cerevisiae* to produce *trans*-resveratrol has been characterized, but the *trans*-resveratrol synthesis only occurs in *E. coli* that expresses TAL when 20 mg/l coumaric acid is added to the medium. Apart from this, no information is available about the ability of other microorganisms described in this work to produce *trans*-resveratrol [31]. In fact, the *de novo* introduction of the entire pathway into selected microorganisms has been more difficult than expected. In the case of *E. coli*, the necessary addition of coumaric acid to the culture medium has the consequence that the activities of TAL or PAL remain low in the bacterium. As a result, much of the ongoing efforts are dedicated to increasing the activities of these enzymes in bacteria, for example, by aiming to develop novel TAL or PAL enzymes [32,33].

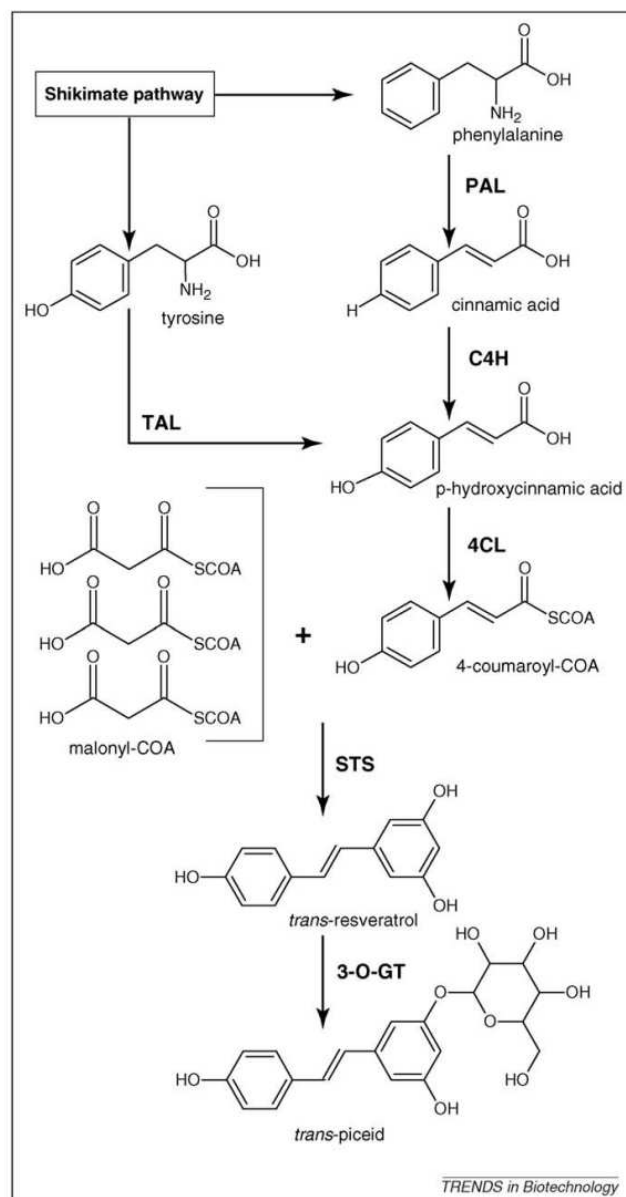


Fig. 1. *Trans*-resveratrol and piceid metabolic pathway. *Trans*-resveratrol can be synthesized either starting with phenylalanine or from tyrosine, both pathways giving rise to p-hydroxycinnamic acid. 4CL transforms tyrosine into 4-coumaroyl-CoA, which is then transformed in *trans*-resveratrol in a reaction catalyzed by STS. *Trans*-resveratrol can be modified to *trans*-piceid by 3-O-glucosyltransferase.

Introducing selective genes

The alternative strategy mentioned above is directed towards transforming microorganisms with both the 4CL and STS genes under utilization of 4-coumaric acid as a precursor, which needs to be added to the culture medium. The first strain of recombinant yeast (SC FY23) described is able to produce *trans*-resveratrol, but only at very low levels (1.45 µg/l) [34]. A transformed *S. cerevisiae* (WAT11 strain) is able to produce 1 mg/l *trans*-resveratrol. When the 4CL and the STS encoding genes that were added to the yeast genome were submitted to protein fusion, the tailored strain exhibited a five-fold increase of *trans*-resveratrol production, which showed the importance of the spatial localization of these two related



enzymes [35]. Subsequently, a recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strain was able to accumulate up to 3.6 mg/l *trans*-resveratrol and this was achieved through an increase in malonate transport and malonyl-CoA synthase activity [36]. Transformation of yeast (*S. cerevisiae*, CEN.PK113-3b strain) and *E. coli* (BL21 strain) with the *4CL* gene from tobacco and *STS* gene from grapevine enabled them to produce 5.8 and 16 mg/l *trans*-resveratrol, respectively [37]. Similarly, a metabolically engineered *E. coli* (JM109 strain), which was transformed with the *4CL* gene from *Arabidopsis thaliana* and a *STS* gene from *Arachis hypogaea*, was able to convert 4-coumaric acid into *trans*-resveratrol, in amounts >100 mg/l [38]. When the same strain (*E. coli* JM109) was modified with a *4CL* gene from *Lithospermum erythrorhizon* and a *STS* gene from *Arachis hypogaea*, *trans*-resveratrol production reached 171 mg/l, as long as coumaroyl-CoA was used as a substrate. When modified analogues of coumaroyl-CoA were used, *trans*-resveratrol production decreased, but unnatural stilbenes were formed. This suggests that engineering of microorganisms might present new perspectives for the synthesis of novel stilbene derivatives with potentially different biological activities [39].

It should be noted that the efficacy of recombinant microorganisms for *trans*-resveratrol production depends on various factors, such as the species and the strain, the origin of the transferred genes, as well as other parameters such as plasmids or precursors used (Table 1). Taken together, these data indicate that the level of *trans*-resveratrol that can be produced by microorganisms remains low, although optimization of the processes might be possible.

Bioproduction of *trans*-resveratrol in plant cells

Cultures of plant cells have been used extensively to investigate the production of secondary metabolites under controlled conditions, such as that of alkaloids, terpenoids, phenolic compounds or heterosides [40–42]. The practical applications of these secondary metabolites mainly lies in pharmaceuticals, flavours, fragrances, dyes, or pesticides,

which cannot be produced easily otherwise, either by microbes or through chemical synthesis [43,44]. The concentration of *trans*-resveratrol that can be produced with the use of plant cell cultures is at least equal to that reported as naturally occurring in the plant, and thus prevents intensive cutting and decimation of the natural sources. Two particular plant-cell model systems are currently in development, cell suspension cultures and hairy roots, and these are further discussed below. Both culture systems are typically carried out in a liquid medium under aseptic conditions, and are adaptable for use in large-scale bioreactors [45–47]. To optimize the production, elicitation has been shown to be the most efficient way to promote plant-cell defences and induce the synthesis and secretion of the compounds of interest [43,48,49].

Cell suspension cultures

Cell suspension cultures represent a reliable model system, both with regard to undertaking basic research of plant defence mechanisms and the *in vitro* production of *trans*-resveratrol. The main advantage of this type of culture is that genetic modification of plant cells is not necessary because the plants used produce *trans*-resveratrol constitutively, or in response to stress, which can be exploited in *in vitro* plant cells using elicitation. Various elicitors [50] can be utilized in cell suspension cultures, and the most commonly used for *trans*-resveratrol production are signalling molecules, such as methyljasmonate (MeJA), as well as other stress inducers including cyclo-dextrins or chitosan [51–60]. The amount of *trans*-resveratrol that can be obtained in response to elicitors fluctuates widely according to plant species, elicitor and culture conditions, as illustrated in Table 2.

Various plants have been used for the production of *trans*-resveratrol under *in vitro* conditions. For example, a cotton cell suspension has been described, which constitutively produced *trans*-resveratrol at up to 7.2 µg/g dry weight [61]. However, the most commonly used plant cell cultures for stilbene production remain those

Table 1. Use of microorganisms for the production of *trans*-resveratrol.

Microorganisms	Species	Introduced genes	Origin of genes	Amount of <i>trans</i> -resveratrol produced	References
Yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	PAL/TAL, C4H, 4CL, STS	<i>Rhodotorula glutinis</i> (PAL/TAL), <i>Streptomyces coelicolor</i> (4CL), <i>Vitis</i> sp. (STS)	1.46 mg/l	[30]
	<i>Lactococcus lactis</i>	PAL, C4H, 4CL, STS	<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL, C4H, 4CL), <i>Rheum tataricum</i> (STS)	–	[31]
	<i>Aspergillus niger</i>				
	<i>Aspergillus oryzae</i>				
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PAL, C4H, 4CL, STS	<i>Arabidopsis thaliana</i> (PAL, C4H, 4CL), <i>Rheum tataricum</i> (STS)	–	[31]
		TAL, 4CL, STS	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (TAL), <i>A. thaliana</i> (4CL), <i>V. vinifera</i> (STS)	5 mg/l	[35]
Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	4CL, STS	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i> (4CL), <i>V. vinifera</i> (STS)	1.45 mg/l	[34]
			<i>Nicotiana tabacum</i> (4CL), <i>V. vinifera</i> (STS)	5.8 mg/l	[37]
			<i>S. coelicolor</i> (4CL), <i>Vitis</i> sp. (STS)	3.6 mg/l	[36]
			<i>A. thaliana</i> (4CL), <i>Arachis hypogaea</i> (STS)	100 mg/l	[38]
			<i>N. tabacum</i> (4CL), <i>V. vinifera</i> (STS)	16 mg/l	[37]
			<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (4CL), <i>A. hypogaea</i> (STS)	171 mg/l	[39]
		TAL, 4CL, STS	<i>A. thaliana</i> (4CL), <i>Rhodobacter capsulatus</i> (TAL), <i>R. tataricum</i> (STS)	–	[31]



Table 2. Use of plant cultures for stilbene production

Plant	Type of culture	Inducer/elicitor	Extracellular ^a	Intracellular ^b	Refs
<i>Arachis hypogea</i>	Hairy roots	Control	0.002 mg/g	–	[67]
		Sodium acetate	0.098 mg/g dry medium	–	[67]
		Control	0.8–1.5 mg/g DW	–	[68]
	Callus	UV-irradiation	–	0.012 mg/g FW <i>t-r</i>	[70]
<i>Vitis amurensis</i> cv. Rupr.	Callus	Sodium nitroprusside	–	0.15% DW <i>t-r</i>	[71]
		Selection on PFP	–	0.25% DW <i>t-r</i>	[71]
		Transformed with <i>rolB</i> genes	–	3.15% (33 mg/g) DW <i>t-r</i>	[71]
<i>Vitis thunbergii</i> cv Sieb. And Zucc.	Callus	Various concentrations of α -naphthaleneacetic acid and 6-benzyl-aminopurine	–	3.7 mg/g DW total stilbenes	[72]
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Cell suspension culture	Control	–	0.0072 mg/g DW <i>t-r</i>	[61]
<i>V. vinifera</i> cv. Barbera	Cell suspension culture	MeJA	13 μ g/g DW	0.039 mg/g DW <i>t-r</i>	[57]
		Chitosan	234 μ g/g DW	–	[60]
<i>Vitis labrusca</i> cv. Concord	Cell suspension culture	L-Alanine	0.54 mg/l	0.01 mg/g FW <i>t-r</i>	[63]
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Teinturier	Cell suspension culture	Control	–	34 mg/l piceids	[51]
		Sugar	–	57 mg/l piceids	[51]
		Control	–	390 mg/l total stilbene	[55]
		MeJA	–	840 mg/l of stilbene with 0.72% <i>t-r</i>	[55]
		Phenylalanine	–	176 mg/l piceids	[53]
		Control	–	280 mg/l piceids	[62]
		¹³ C-Labeled phenylalanine	–	360 mg/l piceids	[62]
		Sugar concentration and MeJA	27 mg/g FW	117 mg/g FW piceids	[59]
		Control	–	93 mg/l piceids	[52]
		dimethyl- β -cyclodextrins	100 mg/l	–	[52]
<i>V. vinifera</i> cv. Gamay Rouge	Cell suspension culture	dimethyl- β -cyclodextrins with a infection by <i>Xylophilus ampelinus</i>	203 mg/l	202 mg/l piceids	[52]
		DIMED	3060 mg/l	–	[64]
		RAMED	3320 mg/l	–	[64]
<i>V. vinifera</i> cv. Monastrell Albino	Cell suspension culture	CAVASOL [®] W7	3280 mg/l	–	[64]
		DIMED	4680 mg/l	–	[64]
		HYPROB	4110 mg/l	–	[64]
		RAMED	5027 mg/l	–	[64]
		CAVASOL [®] W7	4963 mg/l	–	[64]
		DIMED	680 mg/l	–	[66]
		DIMED and MeJA	4000 mg/l	–	[66]

^aConcentrations are for *trans*-resveratrol.^b*t-r* = *trans*-resveratrol.

originating from grapevine. A cell suspension of *Vitis vinifera* cv. Gamay Fréaux var. Teinturier has been shown to be particularly suitable because it is able to produce piceid (3-O- β -D-*trans*-resveratrol glucoside) and various *trans*-resveratrol glucoside derivatives [51]. These compounds are hydrolysed easily into the corresponding aglycones by the action of glucosidases. Piceid production initially reached 34 mg/l, but could be further increased to 57 mg/l upon modulation of the sugar composition in the culture medium. Elicitation with 10 μ M MeJA led to an induction of the *trans*-resveratrol pathway. The concentration of total stilbenes produced was about 390 mg/l and reached a maximum of 840 mg/l 8 days after elicitation [55], and were composed mainly of *trans*-piceid, with only 6 mg/l *trans*-resveratrol, which indicated that most of the *trans*-resveratrol was glycosylated. Piceids often accumulate within cells, whereas *trans*-resveratrol is excreted mostly into the culture medium. The eliciting capacity of MeJA for stilbene production has been confirmed using cells of *V. vinifera* cv. Limberger (50 μ M) [56] and cv.

Barbera (10 μ M) [57]. In order to follow the bioavailability of *trans*-resveratrol in animal organisms, ¹³C-labelled stilbenes can be used. To that end, ¹³C-labelled phenylalanine was added to the culture medium as a precursor, and after elicitation with MeJA (from 10 to 50 μ M), it led to production of up to 231 mg/l ¹³C-labelled stilbenes [53]. A scale-up of this cell culture in 2-l bioreactor with a Rushton turbine led to further increases in the amount of ¹³C-labelled stilbenes, mainly piceids, of up to 280 mg/l [62]. A limitation of this method is the requirement for light in the cell cultures, which prohibits the further scale-up to larger volumes, such as those typically used in stainless steel bioreactors. Furthermore, cell cultures under light do not appear as the best choice because light can also induce the biosynthesis of pigments such as anthocyanins, or *cis*-resveratrol; all by-products that will have to be removed during the extraction process. Other cell suspensions, such as those from *V. vinifera* cv. Gamay produced 27 mg/g FW of *trans*-resveratrol following MeJA elicitation and increased sugar concentration in the culture



medium [59]. L-Alanine also has been shown to induce the synthesis of stilbenes in cell suspension cultures of *V. labrusca* cv. Concord [63].

Dimethyl- β -cyclodextrins also have been tested for their ability to induce the synthesis of stilbenes in cell suspensions of *V. vinifera* cv. Gamay. Without elicitation, only piceids were produced (93 mg/l) and no *trans*-resveratrol could be detected. The addition of 5 mM dimethyl- β -cyclodextrins to the culture medium led to the synthesis of *trans*-resveratrol in amounts of up to 100 mg/l. Furthermore, inoculation with *Xylophilus ampelinus* and the addition of cyclodextrins led to a twofold increase in the amounts of both *trans*-resveratrol (203 mg/l) and *trans*-piceids (202 mg/l) [52].

Other β -cyclodextrins have been employed as elicitors in cell suspension cultures of *V. vinifera* cv. Monastrell and cv. Gamay rouge, and have led to large production of *trans*-resveratrol that has reached more than 3000 mg/l after elicitation with the β -cyclodextrins DIMED, RAMED and CAVASOL[®] W7. Similarly, a Monastrell suspension was able to produce *trans*-resveratrol in amounts higher than 4000 mg/l when DIMED and HYPROB were used as elicitors, and up to 5000 mg/l using RAMED and CAVASOL[®] W7 [64]. Such high *trans*-resveratrol concentrations are possible as β -cyclodextrins not only act as elicitors, but also protect *trans*-resveratrol in the medium by complex formation [64,65]. However, it should be noted that the above experiments have only been carried out on a small laboratory scale (50 ml Erlenmeyer flasks with 10 ml suspension). Recent work using the same cell suspensions has reported *trans*-resveratrol accumulation reaching 680 mg/l, when 250-ml flasks with 100 ml suspension were used and induced by DIMED. In addition, that study also revealed a synergistic effect between MeJA and this particular cyclodextrin, which led to the production of 4000 mg/l *trans*-resveratrol [66]. This suggests that further scale-up is feasible.

Hairy root and callus cultures

Hairy root cultures could also represent a valuable system for the production of plant secondary metabolites [47]. Plant tissues can be transformed by transferring the bacterial plasmid Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*, which causes a genetic modification that leads to the development of roots. These roots are able to grow in liquid media and produce secondary metabolites. For the production of *trans*-resveratrol, hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) were induced when elicited with sodium acetate and *trans*-resveratrol production was increased 60-fold after 24 h, with *trans*-resveratrol representing 99% of the secreted stilbenes (98 μ g/mg dry medium) [67]. As bacterial infection frequency (27.1–75.8%), growth (4.3–7.6 g DW/l) and production of stilbenes (0.8–1.5 mg/g DW) depend on the strain of *A. rhizogenes* [68], strain selection is crucial for successful applications of hairy root technology for stilbene production.

Callus cultures also have been investigated with regard to their ability to produce *trans*-resveratrol. Calli are formed by coalescence of dedifferentiated cells that grow on a solid culture medium, and their production of stilbenes has been linked to the stimulation of plant defence

mechanisms. Calli of peanut have been shown to be able to produce *trans*-resveratrol and piceatannol, a 5'-hydroxyresveratrol that has a higher anticancer activity than *trans*-resveratrol itself [69], at 11.97 and 5.31 μ g/g FW, respectively, 18 h after UV irradiation, which is a well-known inducer of stilbene synthesis [70]. Calli of grapevine also have been used, in particular from *Vitis amurensis* Rupr. and have been shown to synthesize *trans*-resveratrol under control conditions. Treatment of these calli with 0.1 mM sodium nitroprusside significantly increased *trans*-resveratrol production up to 0.15% DW [71]. Calli also have been selected for their capacity to synthesize high amounts of the *trans*-resveratrol precursor phenylalanine, as calli cells are able to overproduce aromatic compounds. Addition of a phenylalanine analogue, *para*-fluorophenylalanine (PFP) to the culture medium led to better growth of cells, which only produce this phenylalanine in large amounts. Under these conditions, *trans*-resveratrol production reached up to 0.25% DW. Subsequent transformation of these calli with the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101/pMP90RK, to introduce a *rolB* gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter, led to constant production of *trans*-resveratrol that reached 3.15% DW. Unfortunately, these transformed calli showed a compact and globular morphology as compared to the friable nature of normal calli, which is not compatible with the establishment of cell suspensions [71]. Work performed with calli of *Vitis thunbergii* Sieb. and Zucc. has indicated that it is possible to stimulate stilbene synthesis using various concentrations of growth regulators, such as α -naphthaleneacetic acid and 6-benzyl-aminopurine [72]. However, large-scale culture of calli remains difficult to establish in terms of space requirements and length of time needed for culturing.

Conclusions

Trans-resveratrol bioproduction has attracted considerable attention, with regard to potential applications for human benefit, and to understand better the molecular mechanisms of *trans*-resveratrol biosynthesis for their potential exploitation. The *trans*-resveratrol metabolic pathway has now been well characterized and comprises four steps, starting from phenylalanine through to *trans*-resveratrol, which are catalyzed by the enzymes PAL, C4H, 4CL and STS. PAL and STS are key enzymes here, and their gene expression and activities have been shown to be enhanced in response to elicitation [66]. Molecular engineering of *trans*-resveratrol production in plants using STS genes has been reviewed recently [14,15], and this approach constitutes a valuable strategy for increasing not only the resistance of plants to disease, but also the nutritional value of agricultural crops and food products.

Considering the numerous biological activities of *trans*-resveratrol and its current uses, it is important to highlight that pharmaceutical and cosmetic industries require not only *trans*-resveratrol, but also other active stilbenes such as piceatannol and viniferins, which are not found in the roots of Japanese knotweed, a common source for *trans*-resveratrol. Thus, patented uses of *trans*-resveratrol (and viniferins) in cosmetics claim grapevine as a raw material, most likely also



because resveratrol and grapevines have been associated with the French paradox. Although *trans*-resveratrol extraction from grape canes has been described as promising [73], its extraction and purification on an industrial scale from these materials remain difficult, expensive [30] and incompatible with sustainable approaches. Furthermore, plant cell cultures recently have been shown to be feasible for overcoming manufacturing problems associated with plant materials in cosmetic applications [74]. Biotechnology using microorganisms or plant cells thus represents environmentally and ecologically friendly strategies that fulfill cGMP requirements, thereby allowing easier and safer purification, as well as pesticide-free production methods.

As discussed above, biotechnological strategies using microorganisms might represent useful means for the production of *trans*-resveratrol. Advantages of microorganisms over plant cells are their high growth rates and their well-established use in fermentation reactions for industrial production of biomolecules. However, as the stilbene pathway does not exist in bacteria, or in yeast, the entire functional pathway needs to be introduced. Thus, the introduction of only one or two genes from the stilbene pathway and supplementing the cells with a precursor might significantly limit the cost and effort required to obtain the desired metabolite, and should be taken into account when considering the entire production process. The JM109 strain of *E. coli* engineered with *4CL* and *STS* genes and fed with coumaroyl-CoA has so far provided the best results in terms of *trans*-resveratrol biosynthesis (171 mg/l) [39]. *Trans*-resveratrol production using yeast is under development currently by the company Fluxome (<http://www.fluxome.dk>).

The advantages afforded by *in vitro* plant cell culture systems result from their putative low production costs when considering that microorganisms and plant cells need similar equipment, such as stirred bioreactors. To date, plant cell suspensions have been optimized for recombinant protein production with low associated production and purification costs [75]. In contrast to the complex fermentation media required for microorganisms, plant media only contain minerals, sugars and traces of growth regulators. Moreover, secondary metabolites can be produced constitutively, or induced by elicitation. Also, biological molecule bioproduction can be achieved in large bioreactors (up to 75 000 l), as used for the production of paclitaxel by Phyton Biotech (<http://www.phytonbiotech.com>). *Trans*-resveratrol itself has been produced in large amounts (5 g/l) from grape cell cultures and has been carried out using elicitation with cyclodextrins, which also act as stabilizers, thereby compensating for the slow growth of plant cells [65]. Comparison of the productivity of recombinant microorganisms and plant cells clearly indicates that *Vitis* suspension cultures might represent a particularly valuable system for production (Fig. 2).

Trans-resveratrol and piceids are the main stilbenes produced in plant cell suspensions, but are localized differently. As *trans*-resveratrol is mainly excreted, its purification can be easily performed using apolar solvents such as ethyl acetate. A better knowledge of *trans*-resveratrol excretion mechanisms through the plant cell wall

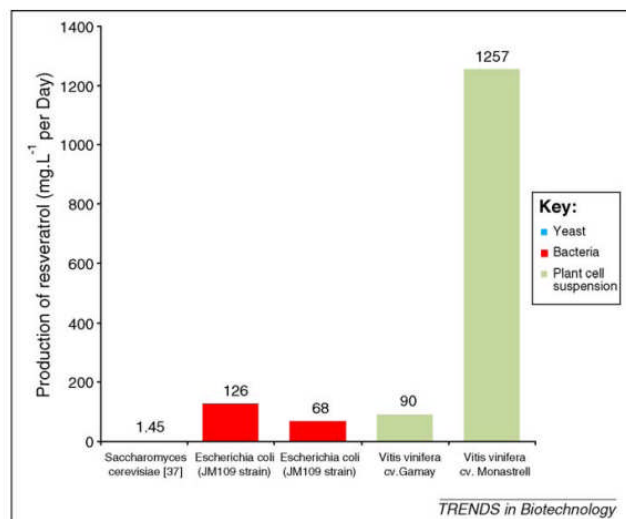


Fig. 2. Comparison of resveratrol productivity between microorganisms and plant cell suspensions. Shown here is the productivity of a transformed yeast, two different transformed bacteria, and two plant cell culture systems. Yeast exhibits the lowest productivity, which indicates that this system would need large optimization efforts. Tailored bacteria show a potentially valuable resveratrol production level. Presently, the best productivity can be obtained with plant cell cultures.

might be of help in further enhancing production/secretion in the culture medium. Indeed *trans*-resveratrol excretion observed in cell suspensions has also been described in leaves [76] and berries of *Vitis* sp. under stress conditions [77], but the transport mechanism of *trans*-resveratrol has not yet been characterized in detail. Recent studies on other phenolic compounds strongly suggest the involvement of ABC transporters, or H⁺-gradient-dependent mechanisms [78]. Targeting transporters, or H⁺ gradients thus appears to be a promising strategy for enhancing the amount of excreted *trans*-resveratrol, especially when the intracellular feedback loop of stilbene synthesis is activated. Interactions between intracellular compartments have been described in biosynthetic pathways, and additional metabolic engineering strategies could thus help to channel intermediates to end products [79].

Nevertheless, the bioproduction of *trans*-resveratrol and other stilbene derivatives remains a considerable challenge. With a focus on *trans*-resveratrol, the use of microorganisms might be valuable, but culture conditions still require optimization with regard to gene expression and its regulation and the level of production. Through elicitation, plant cell cultures, in particular those of grapevine, might provide adequate amounts of *trans*-resveratrol and other active stilbenes that do not require genetic engineering, which at present remains a highly debated point for European consumers. In the future, scale-up to industrial processes has to be achieved and optimized, both for microorganisms and plant cells, in order to develop a sustainable production of *trans*-resveratrol and other stilbenes of interest.

References

- 1 Takaoka, M.J. (1940) Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University* 3, 1–16



- 2 Nonomura, S. *et al.* (1963) Chemical constituents of *Polygonaceous* plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* 83, 988–990
- 3 Jeandet, P. *et al.* (2002) Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741
- 4 Adrian, M. and Jeandet, P. (2006) *Trans-resveratrol* as an antifungal agent. In *In Resveratrol in Health and Disease* (Aggarwal, B.B. and Shishodia, S., eds), pp. 475–497, CRC Press
- 5 Langcake, P. and Pryce, R.J. (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77–86
- 6 Van Etten, H.D. *et al.* (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus 'phytoanticipins'. *Plant Cell* 6, 1191–1192
- 7 Jeandet, P. *et al.* (1995) Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.* 43, 313–316
- 8 Jeandet, P. *et al.* (1995) Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 1–4
- 9 Stervbo, U. *et al.* (2007) A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexine resveratrol in red wine. *Food Chem.* 101, 449–457
- 10 Wang, J. *et al.* (2006) Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 20, 2313–2320
- 11 Grønbaek, M. *et al.* (2000) Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann. Intern. Med.* 133, 411–419
- 12 Burns, J. *et al.* (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3337–3340
- 13 Counet, C. *et al.* (2006) Chocolate and cocoa: New sources of *trans-resveratrol* and *trans-piceid*. *Food Chem.* 98, 649–657
- 14 Delaunois, B. *et al.* (2009) Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol. J.* 7, 2–12
- 15 Halls, C. and Yu, O. (2008) Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 26, 77–81
- 16 Bradamante, S. *et al.* (2004) Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc. Drug Rev.* 22, 169–188
- 17 Aggarwal, B.B. *et al.* (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24, 2783–2840
- 18 Kundu, J.K. and Surh, Y.J. (2008) Cancer Chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett.* 269, 243–261
- 19 Sharma, S. *et al.* (2007) Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide F TNF- α . *Phytother F Res.* 21, 278–283
- 20 Anekonda, T.S. (2006) resveratrol a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* 52, 316–326
- 21 Wood, J.G. *et al.* (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686–689
- 22 Valenzano, D.R. *et al.* (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* 16, 296–300
- 23 Barger, J.L. *et al.* (2008) A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS ONE* 3, 2264
- 24 Pearson, K.J. *et al.* (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8, 157–168
- 25 Walle, T. *et al.* (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1377–1382
- 26 Kaga, S. *et al.* (2005) Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 813–822
- 27 Vercauteren, J. *et al.* Caudalie. Compositions based on Resveratrol, US 6,572,882 B1
- 28 Andre, P. and Renimel, I. LVMH Recherche. Protecting and regenerating composition, US 2007/0243148 A1
- 29 Chemler, J.A. and Koffas, M.A.G. (2008) Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotech.* 19, 597–605
- 30 Huang, L.L. *et al.* Method for the production of resveratrol in a recombinant oleaginous microorganism WO 2006125000 A2
- 31 Katz, M. *et al.* Fluxome Sciences A/S. Metabolically engineered cells for the production of resveratrol or an oligomeric or glycosidically-bound derivative thereof, US 2008/0286844 A1
- 32 Vannelli, T. *et al.* (2007) Functional expression in *Escherichia coli* of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast *Trichosporon cutaneum* for production of p-hydroxycinnamic acid. *Enzyme Microb. Tech.* 41, 413–422
- 33 Xue, Z. *et al.* (2007) Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme Microb. Tech.* 42, 58–64
- 34 Becker, J.V.W. *et al.* (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEM Yeast Res.* 4, 79–85
- 35 Zhang, Y. *et al.* (2006) Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13030–13031
- 36 Huang, L.L. *et al.* Method for the production of resveratrol in a recombinant bacterial host cell, US 2007/0031951 A1
- 37 Beekwilder, J. *et al.* (2006) Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5670–5672
- 38 Watts, K.T. *et al.* (2006) Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 6, 22
- 39 Katsuyama, Y. *et al.* (2007) Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* 14, 613–621
- 40 Dörnenburg, H. and Knorr, D. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb. Tech.* 17, 674–684
- 41 Kieran, P.M. *et al.* (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.* 59, 39–52
- 42 Ramachandra, R. and Ravishankar, G.A. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101–153
- 43 Mulabagal, V. and Tsay, H.S. (2004) Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int. J. Eng. Sci.* 2, 29–48
- 44 Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9, 433–440
- 45 Roberts, S.C. and Shuler, M.L. (1997) Large-scale plant cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 154–159
- 46 Wilson, P.D.G. (1997) The pilot-scale cultivation of transformed roots. In *In Hairy Roots, Culture and Applications* (Doran, P.M., ed.), pp. 179–190, Harwood Academic Publishers
- 47 Guillon, S. *et al.* (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 341–346
- 48 Zhao, J. *et al.* (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23, 283–333
- 49 Namdeo, A.G. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Rev.* 1, 69–79
- 50 Benhamou, N. (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1, 233–240
- 51 Larronde, F. *et al.* (1998) Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Rep.* 17, 946–950
- 52 Morales, M. *et al.* (1998) Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53, 179–187
- 53 Krisa, S. *et al.* (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyljasmonate induction and ^{13}C biolabeling. *J. Nat. Prod.* 62, 1688–1690
- 54 Repka, V. (2001) Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biol. Plant.* 44, 555–565
- 55 Vitrac, X. *et al.* (2002) Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J. Biotechnol.* 95, 49–56
- 56 Repka, V. *et al.* (2004) Methyljasmonate is a potent elicitor of a multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension culture. *Biol. Plant* 48, 273–283
- 57 Tassoni, A. *et al.* (2005) Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* 166, 895–905



- 58 Zamboni, A. *et al.* (2006) Elicitor-induced *trans*-resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis* 45, 63–68
- 59 Belhadj, A. *et al.* (2008) Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol. Bioch.* 46, 493–499
- 60 Ferri, M. *et al.* (2009) Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* 9, 610–624
- 61 Kouakou, T.H. *et al.* (2006) First evidence of *trans*-resveratrol production in cell suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86, 405–409
- 62 Aumont, V. *et al.* (2004) Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J. Biotechnol.* 109, 287–294
- 63 Chen, J. *et al.* (2006) L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Sci.* 171, 734–744
- 64 Bru, M.R. and Pedreno, G.M.L.D.E. (2006) Method for the production of resveratrol in cell cultures, US 2006/0205049 A1
- 65 Lucas-Abellán, C. *et al.* (2007) Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* 104, 39–44
- 66 Lijavetzky, D. *et al.* (2008) Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res. Notes* 1, 132
- 67 Medina-Bolivar, F. *et al.* (2007) Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68, 1992–2003
- 68 Kim, J.S. *et al.* (2008) Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3788–3790
- 69 Lin, L.L. *et al.* (2007) An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 853, 175–182
- 70 Ku, K.L. *et al.* (2005) Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3877–3881
- 71 Kiselev, K.V. *et al.* (2007) The *rolB* gene-induced overproduction of *trans*-resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J. Biotechnol.* 128, 681–692
- 72 Ho, C.W. and Kuo, H.S. *In vitro* resveratrol rich callus tissues derived from *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. and method for producing the same, US 2008/0160560 A1
- 73 Rayne, S. *et al.* (2008) Grape cane waste as a source of *trans*-resveratrol and *trans*-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Ind Crops Prod.* 27, 335–340
- 74 Schürch, C. *et al.* (2008) Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochem. Rev.* 7, 599–605
- 75 Huang, T.K. and McDonald, K.A. (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem. Eng. J.* 45, 168–184
- 76 Blaich, R. and Bachmann, O. (1980) Die *Trans*-resveratrol Synthese bei Vitaceen: Induktion und zytologische Beobachtungen. *Vitis* 19, 230–240
- 77 Fornara, V. *et al.* (2008) Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233, 83–93
- 78 Yazaki, K. (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.* 580, 1183–1191
- 79 Wu, S. and Chappell, J. (2008) Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotech.* 19, 145–152



Objectifs



L'étude de la biosynthèse des stilbènes et en particulier du resvératrol apparaît comme une approche nécessaire pour une meilleure compréhension des mécanismes de défense de la vigne. En effet, les stilbènes procurent une résistance contre les maladies cryptogamiques à certaines espèces de vigne ou à certains cépages. Cette résistance n'est pas liée qu'à la quantité de stilbènes produits, mais surtout aux dérivés stilbéniques synthétisés et à leurs localisations au niveau de la plante (Schnee *et al.*, 2008). Les stilbènes impliqués dans la résistance sont présents dans la plupart des cas en interaction avec les pathogènes au niveau des feuilles ou des baies. Dans ces organes, les stilbènes ne sont pas présents de manière constitutive mais leur synthèse est provoquée par différents types de stress abiotiques ou par une attaque de pathogènes : ce sont des phytoalexines (Jeandet *et al.*, 2010). La vigne est ainsi connue pour répondre aux stress UV (Adrian *et al.*, 2000), aux molécules signal (JA, MeJA), à des sels métalliques (chlorure d'aluminium (AlCl₃) (Adrian *et al.*, 1996) ou encore à des molécules organiques telles que le chitosan (Ait Barka *et al.*, 2004) ou la laminarine (Aziz *et al.*, 2003). Ces différents stress que l'on qualifiera d'éliciteurs provoquent une induction des défenses de la vigne induisant les mécanismes physiologiques et biochimiques qui régissent la synthèse des stilbènes.

Parmi les systèmes de culture permettant d'appréhender la biosynthèse de stilbènes, les suspensions cellulaires sont particulièrement intéressantes dans le sens où elles permettent l'étude et la description de phénomènes cellulaires de manière facilitée par rapport à une étude sur organes et/ou plante entière. Dans le cas du resvératrol et de ses dérivés, de nombreuses suspensions cellulaires de vigne ont été utilisées pour leur étude ou leur bioproduction (Donnez *et al.*, 2009). Dans ces systèmes, l'internalisation du resvératrol dans la vacuole ou son excrétion dans le milieu extracellulaire ont été décrits, reproduisant les observations réalisées sur feuilles (Schnee *et al.*, 2008). Des stilbènes de différentes natures ont pu être obtenus en particulier du *trans*-resvératrol (resvératrol) et des picéïdes. Les picéïdes sont de manière générale décrits au niveau de la vacuole, sauf dans les suspensions de *Vitis vinifera* cv. Barbera où une partie de ceux-ci est retrouvée dans le milieu extracellulaire (Tassoni *et al.*, 2005). Le resvératrol est majoritairement excrété et accumulé dans le milieu de culture (Donnez *et al.*, 2009). Toutefois, une partie de celui-ci adhère aux parois cellulaires (Adrian, 2006b). Les suspensions cellulaires de vigne les plus étudiées sont de l'espèce *Vitis vinifera*. Ce choix est en corrélation avec la vigne cultivée en champ. En effet, cette espèce est sensible aux pathogènes. Une étude basée sur une espèce résistante ou sur un porte-greffe pourrait apporter des éléments nouveaux et serait plus pertinente pour la compréhension des mécanismes liés aux stilbènes.



De plus, une majorité de ces suspensions cellulaires présente une synthèse constitutive en stilbènes (Donnez *et al.*, 2009) et une induction possible mais avec des valeurs de production faibles, sauf dans le cas des suspensions de *V. vinifera* cv. Gamay Rouge et de *V. vinifera* cv. Monastrell Albino élicitée avec des cyclodextrines, qui accumulent jusqu'à 5 g/L de resvératrol dans le milieu (Bru et Pedreno, 2006).

Le premier objectif de ce travail de doctorat a ainsi été de caractériser une lignée cellulaire de *Vitis 41B* cultivée au laboratoire. Le *Vitis 41B*, un hybride de *Vitis vinifera* cv. Chasselas et de *Vitis berlandieri*, est un porte-greffe utilisé dans de nombreuses régions viticoles et en particulier en Champagne, car adapté au sol calcaire. Ces suspensions avaient été décrites pour leur capacité à produire du resvératrol par une élicitation au méthyl jasmonate (MeJA) durant mon stage de Master 2 (Donnez 2006). Cette souche cultivée à l'obscurité présente l'avantage de ne pas produire de chlorophylle et surtout d'anthocyanes qui pourraient interférer dans la biosynthèse, l'extraction et l'analyse des stilbènes. La caractérisation de la souche au niveau de ses conditions de culture, d'élicitation et d'extraction des stilbènes, a pour but d'obtenir un modèle simplifié (i) pour l'étude des mécanismes liés à la synthèse des stilbènes et (ii) pour envisager l'utilisation de cette suspension cellulaire pour la production du resvératrol en grand volume. L'optimisation des conditions de culture et d'élicitation en bioréacteur est donc un enjeu important. L'élicitation au MeJA produit un mélange complexe de composés dont certains non pas été identifiés, mais pourraient appartenir à la famille des stilbènes. Le resvératrol a pu être identifié mais la détermination des autres composés présents fait partie des objectifs de la caractérisation des propriétés de cette suspension cellulaire.

L'hypothèse de l'excrétion du resvératrol a été confirmée par des travaux réalisés sur plantes entières. En effet, l'étude de la STS par immunolocalisation a montré qu'elle était présente à différents niveaux cellulaires, principalement dans le cytoplasme, la vacuole et la paroi (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Le resvératrol serait donc synthétisé et excrété majoritairement dans le milieu extracellulaire. La cinétique de synthèse du resvératrol telle qu'elle a été définie jusqu'à présent est basée uniquement sur les informations obtenues par le niveau d'expression des gènes codant pour la STS et par la mesure de son temps d'apparition après extraction par des techniques de chromatographie (Jeandet *et al.*, 2010). Ces études ne permettent pas une analyse directe et en temps réel de la cinétique d'apparition du resvératrol dans les cellules. En effet, la stilbène synthase est présente dans de nombreux tissus de manière constitutive (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010) et sa présence révélée



par immunolocalisation n'est donc pas corrélée à une synthèse active de resvératrol. De plus, le dosage en HPLC du resvératrol nécessite une extraction des tissus végétaux et la méthode présente un seuil de sensibilité pouvant fausser les données sur le temps d'apparition du resvératrol.

Le second objectif de ce doctorat est donc d'étudier la synthèse précoce du resvératrol, afin de définir plus précisément la localisation de sa synthèse et de son excrétion. La microscopie est un outil pertinent pour l'étude de ces mécanismes car le resvératrol émet une fluorescence intrinsèque spécifique quand il est excité par les ultra-violets. Le suivi de l'apparition de cette fluorescence au niveau des suspensions cellulaires de *Vitis 41B* est apparu comme une stratégie intéressante dans le but de répondre à cet objectif.

Partie 1 : Caractérisation du modèle de culture cellulaire de Vitis 41B et application à la bioproduction.

Cette première partie consiste à évaluer les aptitudes de la culture de *Vitis 41B* à produire du resvératrol. Cette partie a fait l'objet de la rédaction de deux publications (Publications 2 et 3).

Publication 2 : Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor.

Différents traitements éliciteurs ont été réalisés en utilisant le resvératrol comme un marqueur permettant de quantifier leur efficacité. Nous avons choisi le MeJA pour la suite des expérimentations. Cette molécule permet d'obtenir une induction efficace et répétable de la synthèse de resvératrol. Pour mieux caractériser la suspension cellulaire, nous avons procédé à l'établissement d'un suivi de la croissance des cellules en fiole. Différentes concentrations de MeJA ont été testées dans le but de définir la concentration optimale.

Une fois la culture maîtrisée en fiole, le scale-up en bioréacteur de 2 L a été étudié. Nous avons cherché à stabiliser la culture par une optimisation de l'oxygénation et de l'agitation. Dès la détermination de ces paramètres, l'évaluation de la croissance en cuve de 2 L a été réalisée. Nous avons ensuite élicité les suspensions dans ces conditions. La synthèse de resvératrol et d'autres stilbènes a été obtenue. La caractérisation des composés a été réalisée grâce à l'utilisation d'une chaîne UPLC à laquelle sont couplés un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse.



La réalisation de culture en volume de 10 L, ainsi que des approches visant à piéger le resvératrol au cours de son excrétion ont été investies.

L'emploi d'une molécule élicitrice ayant un effet favorable sur la croissance a été envisagé.

Publication 3 : Effect of chitosan and methyljasmonate on resveratrol and ϵ -viniferin productions in a grapevine cell suspension.

L'éllicitation des suspensions cellulaires par le chitosan a été testée dans l'objectif d'obtenir une production de resvératrol sans perte de la viabilité cellulaire. L'ajout de cette molécule, seule ou en synergie avec le MeJA, a été réalisé. Son potentiel sur la croissance des cellules a été évalué.

Des cinétiques plus tardives ont été conduites pour essayer d'expliquer la diminution de la quantité de resvératrol dans le milieu. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude d'une suspension cellulaire de *Vitis labrusca*. Celle-ci a permis d'évaluer le potentiel de notre souche de *Vitis 41B* et de confronter les différents paramètres de culture et d'éllicitation pour les deux souches cellulaires.

Partie 2 : Cinétique d'apparition du resvératrol, localisation de sa synthèse et mécanismes d'excrétion.

Cette partie a pour objectif de comprendre la synthèse du resvératrol. Nous avons utilisé différentes techniques de microscopie. La première a été l'observation des cellules en épifluorescence à différents points de cinétique après éllicitation des cellules. La vidéomicroscopie a ensuite permis de suivre l'évolution de la fluorescence émise par la cellule au cours des 28 heures suivant l'éllicitation pour obtenir des informations sur la cinétique précoce de l'apparition du resvératrol au niveau d'une cellule.

Dans un troisième temps, nous avons développé une méthode d'étude de la synthèse du resvératrol par microscopie confocale. Les observations réalisées lors de différentes cinétiques d'éllicitation des cellules en fioles ont permis des reconstructions en 3D, apportant des informations sur la localisation du resvératrol dans la cellule et sur son excrétion.



Partie 1 : Caractérisation du modèle de culture cellulaire de Vitis 41B et application à la bioproduction.



Tableau 2 : Résumé des différents traitements réalisés et de leurs effets sur les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B dans le but d'induire la synthèse des stilbènes, d'augmenter la vitesse de croissance et de maintenir la production de resvératrol dans le temps.

Traitement		Résultats
Eliciteur	UV	Difficile à mettre en place en culture liquide stérile, les UV ne semblent pas pénétrer en profondeur le milieu.
	Acide salicylique	N'induit pas la synthèse de resvératrol (Donnez, 2006).
	Rhamnolipides	Mort rapide des cellules, ne semble pas induire la synthèse de resvératrol (Courteaux 2007).
	Alanine	Ne montre ni d'effet direct, ni synergique avec le MeJA sur la synthèse de resvératrol.
	Chitosan	Ne montre ni d'effet direct, ni synergique avec le MeJA sur la synthèse de resvératrol (publication 3).
	Sodium orthovanadate	Eliciteur intéressant mais molécule connue pour bloquer les transports actifs, risque de limitation de l'excrétion du resvératrol dans le milieu.
	Méthyl jasmonate	Eliciteur ayant montré la meilleure induction de resvératrol (Donnez <i>et al.</i> , 2010).
Inducteur de croissance	Chitosan	Augmentation de la croissance d'un facteur de 1,5 fois avec une concentration de 10 mg/L de chitosan (publication 3).
Prolongation de la production de resvératrol	Ethyl-acétate dans la fiole de culture	Bon isolement du resvératrol, introduire l'éthyl acétate après élicitation pour permettre le contact entre le MeJA et les cellules.
	Soutirage et ajout de nouveau milieu	Essai intéressant pour le maintien de la production de resvératrol sur 9 jours mais la quantité obtenue est faible.
	Boudin de dialyse avec résine de Séphadex	Stress important des cellules qui induit une perte de viabilité, lié à la modification de l'agitation.
	Résines Amberlite XAD1600	Ces résines peuvent-être utilisées directement dans le milieu, mais la séparation des billes de résine et des cellules est complexe, car les billes et les cellules ont une taille et une masse équivalentes. Toutefois elles semblent très efficaces pour le piégeage de resvératrol.

I. Détermination des propriétés du système et élicitation : croissance, production des stilbènes, caractérisation et application à la bioproduction.

La suspension cellulaire de *Vitis 41B* était présente au laboratoire et certaines conditions de culture étaient définies, comme la composition du milieu et l'agitation. Dans un premier temps, une évaluation de la croissance de cette suspension cellulaire a été réalisée. La détermination de la courbe de croissance permet non seulement de définir le temps de doublement mais aussi d'obtenir la durée des trois phases caractéristiques de culture : la phase stationnaire, la phase exponentielle et la phase de plateau. Ces différentes informations sont nécessaires pour réaliser des expérimentations pertinentes avec un système de suspension cellulaire. La courbe de croissance et les conditions expérimentales utilisées dans l'étude de ce système sont présentées dans la publication 2.

Les conditions de culture étaient au départ optimisées pour une culture en fiole d'Erlenmeyer de 300 mL contenant 100 mL de suspension. Toutefois le système cellulaire développé doit permettre de réaliser l'étude de nombreux mécanismes de défense chez la vigne. Le développement de la culture en bioréacteur a donc représenté un enjeu majeur. En effet, la possibilité de scale-up en culture de 2 L et plus permet l'obtention d'une biomasse importante en restant sur un système de culture végétale permettant, par exemple, de quantifier des protéines, des composés produits en faible quantité ou suivre des activités enzymatiques. L'optimisation de la culture en bioréacteur est présentée dans la publication 2.

Une fois les conditions de culture définies et le système caractérisé, la recherche d'un éliciteur capable d'induire la synthèse du resvératrol de manière reproductible a été menée. Différents stress ont été envisagés pour cette étude, comme les UV-C, ainsi que l'emploi de différentes molécules (Tableau 2). L'éliciteur ayant montré la plus grande efficacité est le méthyl jasmonate (MeJA). Cet éliciteur a fait l'objet d'une étude approfondie dans le but de définir les concentrations optimales d'utilisation, la cinétique de production de resvératrol, ainsi que ses effets sur la biomasse. L'élicitation avec cette molécule a aussi été effectuée sur des cultures en bioréacteur. La publication 2 présente l'ensemble de ces résultats ainsi que l'étude quantitative de la synthèse du resvératrol produit et la caractérisation d'autres dérivés stilbéniques et notamment des oligomères.



Publication 2 : Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor

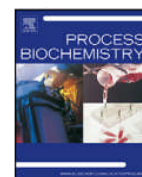




Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio



Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor

David Donnez^a, Kyung-Hee Kim^b, Sandrine Antoine^{a,1}, Alexandra Conreux^c, Vincenzo De Luca^b, Philippe Jeandet^c, Christophe Clément^a, Eric Courot^{a,*}

^a Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche «Vigne et Vins de Champagne – Stress et Environnement», EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims cedex 02, France

^b Department of Biological Sciences, Brock University, 500 Glenridge Avenue, St. Catharines, Ontario L2S 3A1, Canada

^c Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, Unité de Recherche «Vigne et Vins de Champagne – Stress et Environnement», EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims cedex 02, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2010

Received in revised form 11 January 2011

Accepted 17 January 2011

Keywords:

Bioproduction

Plant cell cultures

Resveratrol

Stilbenes

Stirred bioreactor

Elicitation

ABSTRACT

A cell suspension culture was developed from calli of grape rootstock 41B in order to study the bioproduction of resveratrol. While 41B grape cultures produced no resveratrol, methyljasmonate (MeJA) elicitor treatment activated its production in a dose dependent manner. The concentration of 0.2 mM MeJA was optimal for efficient production and high accumulation of resveratrol (150 mg/L) in flask experiments. Microscopic analysis of cells monitored for viability showed that MeJA elicitor triggered expression of resveratrol fluorescence within the cells. These results led to scale-up of the culture in a 2 L stirred bioreactor where a resveratrol production of 209 mg/L being secreted into the liquid medium, corresponding to 90% of the total production. Liquid/liquid extraction of the culture medium and a solid/liquid extraction of the cells showed that other stilbenes were also produced. For the first time, *trans*- ϵ -viniferin, *trans*- δ -viniferin, and a *trans*-3-methylviniferin as well as *trans*-piceatannol were identified in a 2 L bioreactor cell cultures of grapevine. Furthermore, a one step FPLC method was developed for the purification of resveratrol and ϵ -viniferin.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Grape stilbenes are a family of plant polyphenols in which *trans*-3,5,4'-tri-hydroxystilbene named resveratrol is best known for its numerous biological activities. Resveratrol is a key precursor of different oligostilbene dimers (ϵ -viniferin and δ -viniferin) [1,2], trimers (α -viniferin) [3] and tetramers (*r*- and *r*-2-viniferins) that have been characterized in grape plants [4], while stilbene dimer glucosides were identified in grape cell cultures [5]. There is considerable interest in resveratrol due to its biological properties (antioxidant and disease control) that may contribute to increase lifespan of diverse organisms [6–8]. The role(s) of resveratrol in human health may include (i) protection of the cardiovascular system [9] by inhibiting platelet aggregation [10], (ii) prevention and treatment of some forms of cancer [11] and (iii) modulation of *Sirtuin-1* gene expression [12] that may have effects against diabetes [13].

Related to the French paradox, nutraceutical use of resveratrol has been possible since the glycosylated derivatives, piceid and polydatin, can be obtained in large and inexpensive quantities from the Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*, *Fallopia japonica*) for conversion into the aglycone. More recently, resveratrol oligomers that are not present in Japanese knotweed but useful for the cosmetic industry [14,15] have been obtained from grapevine as raw materials. For example, the stilbene ϵ -viniferin is now being used in cosmetic applications and also has been introduced in nutraceutical formulations. The economics for production of these oligomers from grapevine remain limiting since large amounts of costly organic solvents are required for their extraction and purification [14,16]. This has led to alternative strategies for the bioproduction of resveratrol and/or derivatives using microorganisms and plant cells [17]. The aim is to produce pure resveratrol, and potentially viniferins, by the mean of biotechnological processes without using plants but with sustainable protocols of extraction, as realized for example for taxanes (www.phytonbiotech.com).

While cultivation of grapevine under natural conditions will lead to the production of resveratrol and related derivatives, these secondary metabolites are also viewed as phytoalexins with anti-biotic properties that are biosynthesized *de novo* and are secreted

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 34 41; fax: +33 3 26 91 34 27.

E-mail address: eric.courot@univ-reims.fr (E. Courot).

¹ Present address: GEQA, Institut National de la Recherche Agronomique, 20230 San Giuliano, France.



following pathogen perception [18]. A relationship between the capacity of grapes to produce stilbenes and their resistance to disease was clearly established for powdery mildew [19]. In addition biosynthesis of these phytoalexins may be artificially induced by treating cells with elicitors that mimic a pathogen attack and trigger their defense mechanisms [20]. This property was shown in grapevine leaves where β -aminobutyric acid could elicit expression of stilbene synthesis and accumulation when cells were inoculated with *Plasmopara viticola* [21]. Stilbenes were also produced in grapevine cell suspension cultures when they were treated with various elicitors. For example the use of chitosan induced resveratrol and mono-glucosylated stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera* cells [22,23]. Methyljasmonate (MeJA) appears to be a better inducer [24–27], since treated cells produced 840 mg stilbenes/L over 8 days, including mainly piceids whereas only 0.72% of the total was resveratrol [28]. The most powerful elicitor to trigger resveratrol production seems to be cyclodextrin, stimulating cultures that accumulate greater than 5000 mg resveratrol/L in the culture medium [27,29]. In particular, resveratrol was shown to be mainly released in the culture medium whereas piceids were accumulated within the cells [17]. Despite the interest in using *trans*-resveratrol and its derivatives for health purposes, production by cell suspension cultures has been limited to small volumes of culture. There are currently few available examples for production of these metabolites using a larger bioreactor. A scale-up to a 2 L bioreactor of grapevine cell suspension cultures from *V. vinifera* cv. Gamay Fréaux var. Teinturier was optimized to produce stilbenes reaching 360 mg/L but these cultures only accumulated *trans*-piceid [30]. More recently, a 1 L fed-batch bioreactor was used for the production of resveratrol derivatives [23]. The present study describes a grape cell suspension culture line derived from grape rootstock 41B that accumulates resveratrol and different stilbene oligomers following elicitation with MeJA. The scale up in a 2 L bioreactor was performed and extracts were analyzed for stilbene production by HPLC, FPLC and UPLC–MS that led to the identification of resveratrol and viniferins for the first time in such a volume of culture.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture flask experiments

Stock cell suspension cultures derived from rootstock 41B (*V. vinifera* cv. Chasselas $\times$ *Vitis berlandieri*) were maintained in Erlenmeyer flask of 300 mL containing 100 mL of a modified Murashige and Skoog (MS) liquid culture medium [31] supplemented with 0.5 mg/L of benzylaminopurine (BAP), 0.2 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 3% sucrose. Cell suspensions were cultured in darkness at 23 °C on a rotary shaker at 110 rpm and subcultured every week. Cell growth and production time courses were initiated and conducted in triplicate by introducing 10 g of fresh filtered cells in 300 mL flasks containing 90 mL of MS medium.

2.2. Bioreactor experiment

Two hundred milliliters of the stock cell suspension in exponential phase was transferred to a 1 L Erlenmeyer flask and the volume was adjusted to 400 mL with the MS medium. The flask was maintained in darkness at 23 °C on a rotary shaker at 80 rpm. After one week of culture, the 400 mL of suspension was transferred using a peristaltic pump into the 2 L tank of a stirred glass bioreactor equipped with a marine turbine (New Brunswick Scientific, Bioflo 3000). The volume was then adjusted to 2 L with MS medium by pumping. A control culture without elicitation (150 g FW of inoculum) was performed during 22 days at 23 °C in darkness. The speed of the turbine was set to 50 rpm and the aeration rate was 0.025 vvm. The same protocol was used for the MeJA elicited culture with an inoculum of 100 g FW cells that were cultivated for 18 days. Aliquots of 20 mL of suspension were removed with the sample tool of the bioreactor to follow the growth. At the end of the culture, cells and medium were separated by filtration under reduced pressure and then frozen at –80 °C until utilization.

2.3. Elicitor treatment

After 5 days of culture, corresponding to cells in the exponential phase, 500, 1000 and 2500 μ L of a solution of methyljasmonate (MeJA) (Sigma) mixed in 50%

EtOH (40 mM) were introduced into the flasks containing 100 mL of cell suspension to obtain, respectively, the final concentrations of 0.2, 0.4 and 1 mM MeJA. To control for the effect of EtOH, replicate experiments were performed by the addition of the same volume of ethanol without MeJA. Cell growth and resveratrol production were monitored for 10 days. All experiments were performed in triplicate. Cell integrity was monitored by microscopic observations (visible, epifluorescence without or with fluoresceine diacetate (FDA)). Using bioreactor, after 14 days of culture, while the cells are in exponential phase, 10 mL of 0.4 mM MeJA was added to obtain a final concentration of 0.2 mM. Cells were harvested 4 days later, as the maximal production of resveratrol at 96 h after elicitation appeared as a characteristic of the cell suspension 41B.

2.4. Stilbene extraction

Cells and medium were filtered under reduced pressure and the biomass weighted to obtain the fresh weight (FW). Cells and medium were then stored at –80 °C until extraction. Medium was extracted with the same volume of AcOEt and the organic phase was evaporated to dryness using a rotavapor (Laborata 4000 Efficient, Heidolph). The concentrate was resuspended in 1 mL of MeOH for the flasks experiments and in 15 mL of MeOH for the bioreactor medium extract. Cells were freeze-dried to get the dry weight (DW) and then refluxed for 30 min in MeOH. The solution obtained was filtered, concentrated using the rotavapor, and resuspended in 1 mL MeOH (flask extract) and 50 mL MeOH (bioreactor extract).

2.5. Microscopic observations of the cells

The cells were monitored by fluorescence microscopy using an Olympus BH2 microscope equipped with a UV light source (BH2-RFL-T3; Olympus) and a fluorescent filter (BP495; Olympus). To determine their viability, cells (1 mL) were incubated for 5 min in a 1% FDA solution diluted with acetone in darkness before microscopic observation. Viability was then estimated using Malassez cell counting.

2.6. HPLC analysis

Ten microliters of the methanolic extracts were injected onto a Waters Spherisorb C18 S50DS2 4 HPLC column (6 mm $\times$ 250 mm). The HPLC system used was a Waters apparatus equipped with a 510 pump, a 600 gradient controller, a 2487 UV–vis detector and a 717 automatic sampler maintained at 4 °C. Elution solvents used were A: CH₃CN (Acros Organics) and B: H₂O (Direct Q5 Millipore). The gradient performed was the same as described in [32]. UV detection was monitored at 285 and 307 nm, respectively.

2.7. FPLC separation

The FPLC protocol for separation of stilbenes was adapted from Gu et al. [33]. Five hundred microliters of cell methanolic extract were applied with a 500 μ L injection loop to a Superdex 75 (GE Healthcare) column (280 mm $\times$ 5 mm) using an Äkta Prime chromatography system (GE Healthcare). The elution gradient was produced by the mixing different proportions of solvent A (30% EtOH/30% CH₃COOH) and solvent B (milliQ water). The flow applied for the elution was 1 mL/min and the column was pre-equilibrated with 30% of solvent A and 70% of solvent B. After injection, the gradient was the following: 75 min 30% A/70% B; 75 min 60% A/40% B; 100 min 100% A/0% B; 100 min 30% A/70% B. The FPLC analysis was realized in triplicate.

2.8. UPLC–MS analysis

A Waters ACQUITY™ ultra-performance liquid chromatography consisting of binary solvent manager, sample manager, photodiode array detector and Maslynx 4.1 software was equipped with mass spectrometry as an electrospray ionization source (UPLC–ESI/MS). The UPLC profiling was performed on a 50 mm $\times$ 2.1 mm BEH C18 column packed with 1.7 μ m particles (Waters) utilizing a gradient elution profile. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 100% MeCN (solvent B). The gradient for 8 min was as follows: 0 min, 100% A; 0.6 min, 92% A; 6.0 min, 70% A; 6.50 min, 50% A; 7.0 min, 40% A; 7.50 min, 92% A; 8.0 min, 100% A. The column temperature was maintained at 40 °C with a constant flow rate of 0.3 mL/min. Chromatograms were analyzed at 305 nm and 320 nm for stilbenes. The injection volume was 3 μ L and all samples were passed through 0.2 μ m syringe filter before analyses. MS was performed in the negative ion mode, at a capillary voltage 3.45 kV, cone voltage 30 V and source temperature at 150 °C with a gas flow rate of 450 L/h.

3. Results and discussion

3.1. Cell growth and resveratrol production in Erlenmeyer flasks

The growth curves of *Vitis* 41B cell suspension showed a similar profile as determined by their fresh (FW) or dry (DW) weight. Cells grew exponentially for 14 days followed by a 5 days stationary

Please cite this article in press as: Donnez D, et al. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. Process Biochem (2011), doi:10.1016/j.procbio.2011.01.019



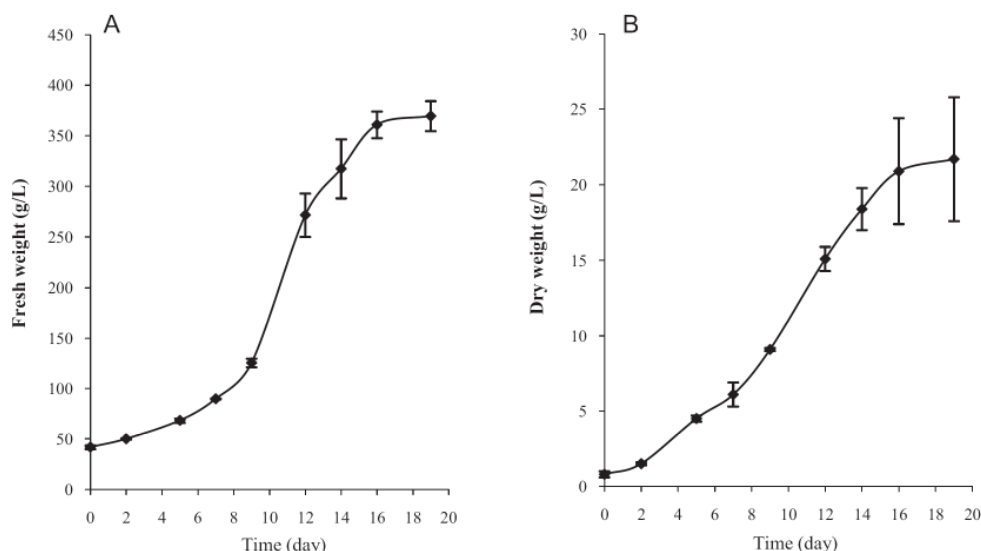


Fig. 1. Growth curves of *Vitis* 41B cell suspension in Erlenmeyer flasks conditions: fresh weight (A) and dry weight (B). Each point is the average of 3 independent experiments carried out in triplicate. 10 g of cells was introduced in 300 mL flasks containing 90 mL of MS medium in order to get the fresh weight and the dry weight during a period of 19 days.

phase (Fig. 1). The doubling time of cell DW was established at 95 h and the dry biomass reached a maximal value of 21.7 ± 4 g/L corresponding to 369.2 ± 14.8 g/L of FW at day 19 of growth. The lag phase observed could be correlated with the protocol consisting in the transfer of filtered fresh cells in the medium, as equivalent results have been obtained with cells cultured without ethanol (data not shown).

In flask experiments, elicitation by MeJA induced a change of cell color from yellow to dark brown and cell growth was inhibited with the three MeJA concentrations over the entire time course of the experiment compared with the non-treated control (Fig. 2A), as previously described using other grapevine cell strains [25]. Cells cultivated with 0.2 and 0.4 mM MeJA only represented 20% FW of control cultures after 10 days of growth. Cells cultivated with 1 mM MeJA, died after 4 days, while in the presence of 0.2 mM of MeJA, only 50% of treated cells died after 4 days (Fig. 3A and B). The production of resveratrol was only monitored in the medium since preliminary studies showed that less than 10% of the total resveratrol accumulation occurred within the cells (unpublished results). Control cells and 1 mM MeJA-treated cells did not produce resveratrol (Fig. 2B) and did not show characteristic fluorescence under the microscope (Fig. 3C). Treatment of cells with 0.4 mM MeJA triggered maximal synthesis and accumulation of resveratrol 3 days after elicitation reaching 45.2 mg resveratrol/L. This production rapidly decreased and remained stable (18 mg/L) until day 10. Elicitation with 0.2 mM MeJA led to the highest production of resveratrol at day 4 (150.8 mg/L), also followed by a decrease, down to same level as for 0.4 mM MeJA.

Without MeJA treatment, no resveratrol synthesis occurred in the 41B cell culture, in contrast with other studies reporting resveratrol accumulation in cell suspensions of *Vitis* sp. before elicitor treatment [25,28]. The resveratrol production observed in 41B cells with MeJA (0.2 and 0.4 mM) could thus be associated with a *de novo* synthesis and the accumulation of 150 mg resveratrol/L demonstrated the high response of 41B cells to MeJA elicitation. Previous studies suggested that MeJA was a poor elicitor of resveratrol synthesis in grapevine cell cultures [25], since the main compounds found were piceids, the glucosides of resveratrol [26]. MeJA is a well known elicitor and our results confirmed its role for the induc-

tion of stilbene synthesis combined with growth inhibition for each tested concentration, a phenomenon also observed in other grape cell cultures [25]. Cell death was described in *Vitis* leaves treated with MeJA [24] and it has been suggested that MeJA affects microtubules activity that may perturb cell division [34]. Although the inhibition of cell growth was an important phenomenon, the production potential was not affected by cell death since high levels of resveratrol were produced in our cultures 4 days after elicitation, in particular when using 0.2 mM MeJA.

3.2. Resveratrol production in bioreactor

The results obtained in flask cultures showing the high level of resveratrol production with MeJA stimulation of *Vitis* 41B cell cultures prompted tests to scale-up production in a 2 L bioreactor. Cultured plant cells are large compared to those of microorganisms and their cell walls appear to be more sensitive to shear stress. For these reasons, we have focused on the scale-up of grape cell cultures by optimizing both the aeration and agitation rate parameters (Table 1). From these results, it was clear that grape cells were very sensitive to the speed of agitation and that it was also necessary to limit the aeration of the culture. Setting the speed of agitation to 50 rpm and the aeration rate to 0.025 vvm led to a biomass of 546 g FW after 22 days of culture, representing a 3.64-fold augmentation in biomass from the initial inoculation and a biomass productivity of $18 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (Fig. 4). Considering the volume of culture and the physical conditions, i.e. the biomass inoculum, it was necessary to maintain the culture for a 22 days period in order to obtain the exponential growth phase. The lack of stilbene production in control cultures was confirmed by microscopic observations and HPLC analysis. This result confirmed the ability of 41B cells to be cultured in 2 L bioreactor and prompted studies on resveratrol accumulation in response to MeJA elicitation. The culture was conducted for 14 days before addition of 0.2 mM MeJA in order to be in the exponential phase. A further cultivation for 4 days before harvesting the media and the cells was realized as all the experiments conducted with the 41B cells, both in flasks or bioreactor, have shown that the maximal production of resveratrol occurred 4 days following the addition of the elicitor. This type of result



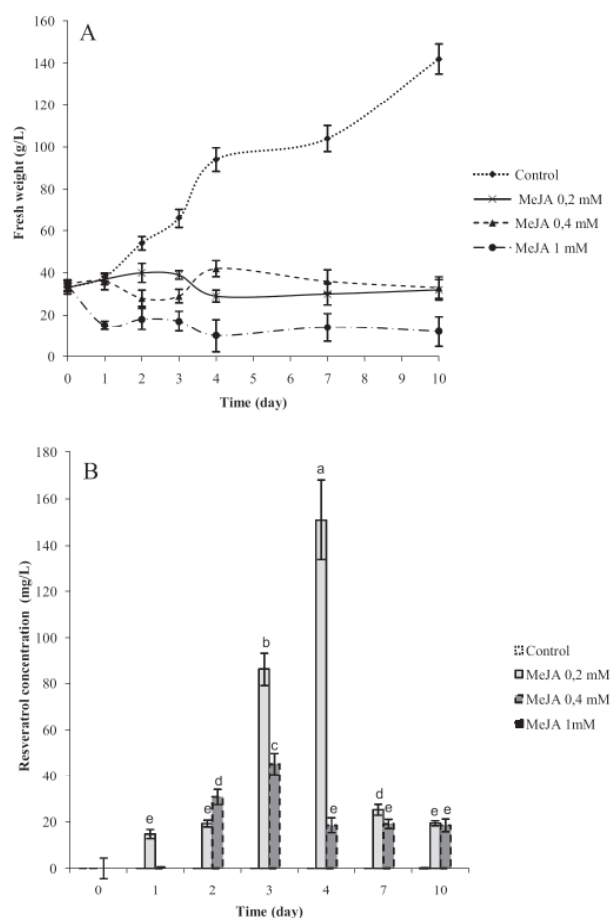


Fig. 2. Effect of different MeJA concentrations (0, 0.2, 0.4 and 1 mM) on cell growth curve (A) and production of extracellular resveratrol (B) in flasks experiments. Each point is the average of 3 independent experiments carried out in triplicate. Significance of differences was analyzed using a two-tailed Student's *t*-test with $p < 0.05$ as significant. MeJA was diluted in ethanol and the same quantity of ethanol was added in the control. After filtration, the medium was washed with AcOEt and after concentration the resveratrol was quantified by HPLC.

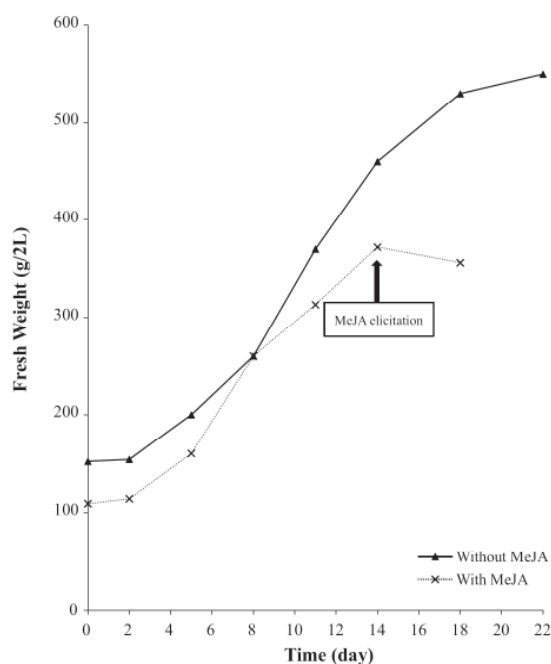


Fig. 4. Growth curves of *Vitis* 41B cell suspension in 2 L stirred bioreactor conditions; with or without 0.2 mM MeJA elicitation. Growth is determined by sampling aliquots of the cell suspension (20 mL) using the sample tool of the bioreactor Bioflo 3000.

has been observed with *Monastrell* cells which also exhibit a high concentration of resveratrol in the medium of culture after 96 h [29]. Under these conditions a biomass of 356 g FW was obtained, representing a 3.56-fold augmentation in biomass from the initial inoculation and a biomass productivity of $16 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (Fig. 4). These results indicate that 100 g of cell inoculum led to a slower growth in term of biomass, especially after 14 days of culture but slightly inhibited the productivity rate. As observed in flasks, cells became brown and showed the same alterations under microscopic observations, leading to a growth inhibition (unpublished results). Extraction of the culture medium (1.7 L) for stilbenes pro-

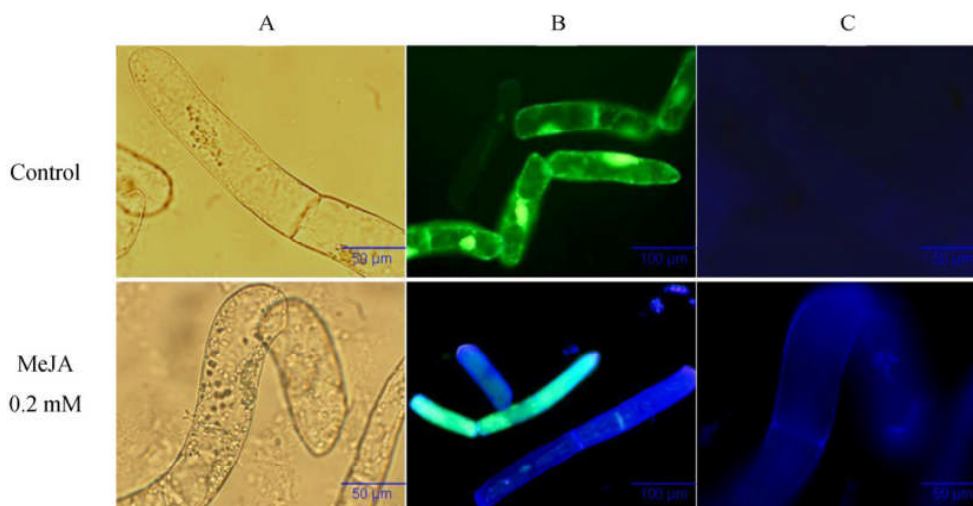


Fig. 3. Microscopic observation of *Vitis* 41B cells cultured in flasks under control conditions or 4 days after elicitation with 0.2 mM MeJA. Cells were observed with transmission light (A), with epifluorescence UV light after treatment with FDA for monitoring cell viability (B) and with epifluorescence UV light to detect resveratrol and derivatives (C).

Please cite this article in press as: Donnez D, et al. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. Process Biochem (2011), doi:10.1016/j.procbio.2011.01.019



Table 1

Different cross combinations tested between agitation and the aeration rate and their effect on the cell productivity ($\text{g FW L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) in order to determine the optimal culture conditions.

Agitation (RPM)	Aeration rate (vvm)						
	0.1	0.08	0.06	0.04	0.02	0.01	0.005
50	0 ^a	5 ^b	12 ^c	18 ^d	12 ^c	9 ^c	
75							
100			0 ^a				
125							

^a A strong agitation or a high aeration rate provoked a stress of cells and their accumulation, during the culture time course, on the upper part of the tank outside of the culture medium.

^b The cells showed a quick change of color from yellow to light brown, their growth was inhibited and a loss of viability was measurable by counting (data not presented).

^c Cells had a good growth but slower than in the case^d.

^d This condition showed the most interesting result in terms of growth and viability.

^e Cells did not present stress signs as in case^b, but most of the cells were accumulated on the bottom of the tank.

duced a yield of 209 mg resveratrol/L while extraction of cells only produced a resveratrol yield of 1.4 mg/g DW or 0.1 mg/g FW corresponding to 21 mg/L of culture. The HPLC profile obtained with the bioreactor cell extract (Fig. 5A) clearly showed the production of other stilbene compounds in addition to resveratrol that included the presence of ϵ -viniferin based on comparison with a pure standard (Actichem, Montauban, France). This protocol resolved one major peak eluting at 179 mL on the FPLC column (UPLC peak

1, fractions 42–44) composed of 97% *trans*-resveratrol and 3% of other stilbenes and this represented more than 70% of the resveratrol loaded on the column. Fraction 50 was composed mostly of *trans*- ϵ -viniferin (80%) (UPLC peak 3, fraction 50) while two other stilbenes, possibly ϵ -methylviniferin (UPLC peak 4) and *trans*- δ -viniferin (UPLC peak 5) (Fig. 5D) were detected in fractions 54 and 55. Other *cis*-stilbenes were also found in very small amounts (data not shown). In order to check if these compounds could be also identified in flask-grown cultures, extracts from both media and cells were analyzed by HPLC. The profiles obtained showed the presence of viniferins both within the cells and in the medium of culture. As for resveratrol, no derivatives were obtained in control cells. As observed, the 41B cells did not produce piceids as all the stilbenes described were found in their free form. The quantity of stilbenes remained low within the cells, and the resveratrol, in particular, was excreted in a high quantity. At the opposite, if piceids were synthesized they would be accumulated into the vacuolar compartment of the cells [28]. These characteristics of 41B cells could be related with the ability of rootstocks and grapevine cultivars that are resistant to fungi, to convert free resveratrol into viniferins [19].

Despite the interest in medical, nutritional and cosmetic uses for resveratrol and its derivatives, only a few studies appear to have described the production of stilbenes in bioreactor [23,30]. Producing high quantities of resveratrol by plant suspension cultures still remains a challenge [17] and results obtained in Erlenmeyer flasks need to be confirmed in higher volumes using bioreactors. For example, a high level of resveratrol (up to 4000 mg/L) has been obtained using cyclodextrins as elicitors in *V. vinifera* cv. Monastrell

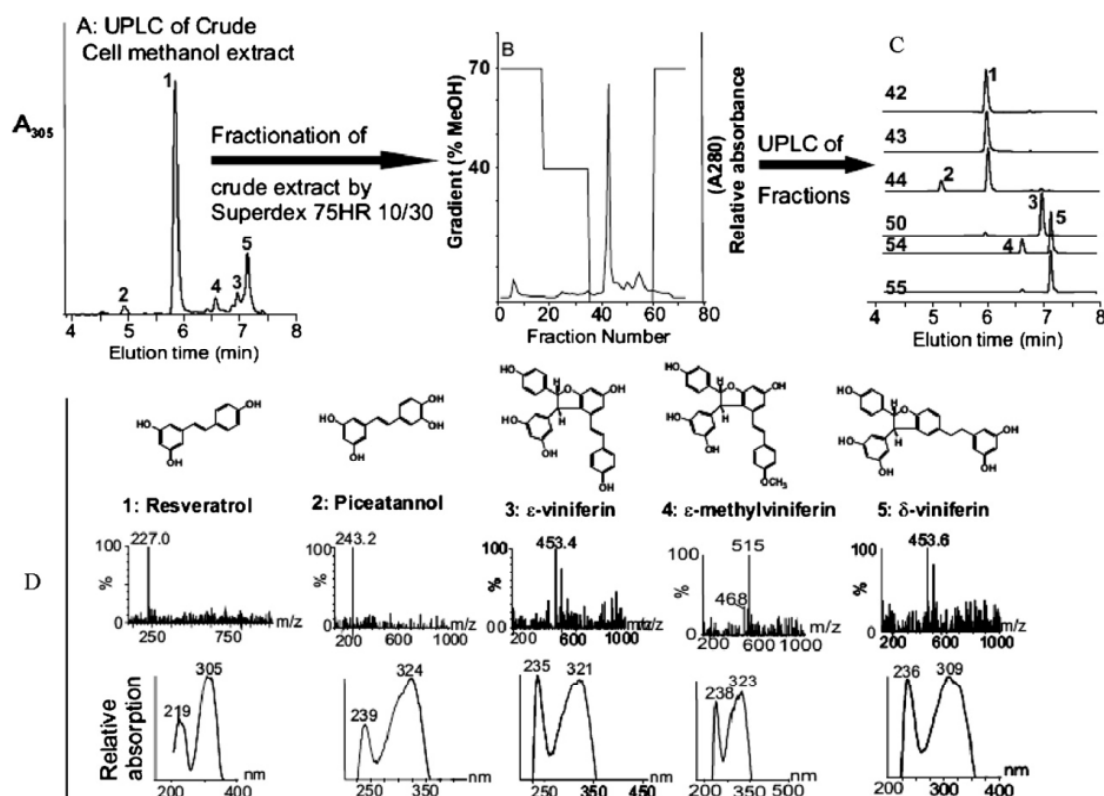


Fig. 5. Analysis of resveratrol and derivatives in the cell extract of MeJA treated cell cultures in a 2 L bioreactor. (A) UPLC profile of crude stilbenes found in the cells of MeJA treated cultures. (B) FPLC purification of crude stilbenes by fractionation on a Superdex 75 28/0.5 column. (C) UPLC profile of individual stilbenes in fractions 42, 43, 44, 50, 54 and 55 eluting from Superdex 75 28/0.5 column chromatography. (D) The MS absorption and the UV spectra of individual stilbenes that were used to identify (1) *trans*-resveratrol, (2) *trans*-piceatannol, (3) *trans*- ϵ -viniferin, (4) *trans*- ϵ -methylviniferin, and (5) *trans*- δ -viniferin.

Please cite this article in press as: Donnez D, et al. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. Process Biochem (2011), doi:10.1016/j.procbio.2011.01.019



cells cultured in 10 mL of medium, but this quantity decreased to 680 mg/L when the experiment was repeated using a 100 mL volume [27]. Among the different types of bioreactors developed for plant cell cultures, we have chosen the classical stirred bioreactor, commonly used for cell culture experiments. The 2 L bioreactor scale-up showed that 41B cells were preferably cultured with a marine impeller that limited shear stress rather than using the Rushton turbine where growth was very poor. While the bioreactor growth of cells was slower than those cultivated in flasks, a tripling of their biomass could be obtained after 14 days of culture and further optimization of cell growth should be feasible as shown for other cultures [30]. The conditions using 0.2 mM MeJA and harvesting 4 days after elicitation showed that resveratrol represented >90% and 80% of the stilbenes produced in the medium and in the cells, respectively. In addition to the large amounts of resveratrol found in the culture medium, small amounts of *trans*-piceatannol, ϵ -viniferin, ϵ -methylviniferin, and *trans*- δ -viniferin were obtained. The presence of these resveratrol derivatives in the cells is quite interesting since it is the first description of these compounds in a grapevine cell culture in a bioreactor. These results suggest that rootstock 41B cell cultures could be used as an interesting model system to study viniferin biosynthesis since their *in vivo* metabolism remains incomplete. While it remains to be clearly shown viniferins may be produced through oxidative dimerization of resveratrol [35] by peroxidase mediated processes [36], ϵ -Viniferin is a major phytoalexin in leaves while it is a constitutive compound in woody part of grapevine [2] and δ -viniferin (resveratrol dehydrotimer) has been described in leaves [2] growing under stress [5]. These oligomers have been also characterized in cell suspension of *V. vinifera* but in a volume of 50 mL [37].

The secretion of free resveratrol in the medium could be related to active transport mechanisms involving ABC transporters, or H^+ -gradient-dependent-mechanisms, as described for other secondary metabolites [38] and their characterization remains to be established for resveratrol in plant cells. Moreover, it has been suggested that the localization of the stilbene synthase enzyme (STS) close to the cell wall in grape berries of *Vitis* sp. is linked to an excretion mechanism of resveratrol [39]. This is of practical importance since excretion of most of the resveratrol produced in the culture medium could facilitate its extraction. In the conditions of elicitation used, 41B cells synthesize and accumulate resveratrol as a typical 'phytoalexin' response, since no resveratrol is found in control culture. Furthermore, a dynamic synthesis appeared with both the release of resveratrol in the medium by unknown mechanisms and the ability of cells for *de novo* synthesis of resveratrol derivatives.

4. Conclusions

We report here for the first time the bioproduction of both resveratrol and viniferins by a grapevine cell culture in a 2 L bioreactor at attractively high levels. Purification of resveratrol appeared to be easier from the culture medium, as it was the major compound produced and excreted by cultured cells. Optimization of resveratrol production could be considered through the comprehension of the excretion mechanisms of resveratrol in order to channel it through the cell wall, but also by studying the biochemical mechanisms involved in the synthesis of viniferins in association with the scale up in higher volumes of culture.

References

- [1] Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 1977;32:151–2.
- [2] Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O. δ -Viniferin, a resveratrol dehydrotimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J Agric Food Chem* 2003;51:5488–92.
- [3] Pryce RJ, Langcake P. α -Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* 1977;16:1452–4.
- [4] Korhammer S, Reniero F, Mattivi F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 1995;38:1501–4.
- [5] Waffo-Teguo P, Lee D, Cuendet M, Mérillon JM, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J Nat Prod* 2001;64:136–8.
- [6] Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 2006;16:296–300.
- [7] Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS ONE* 2008;3:2264.
- [8] Goswami SK, Das DK. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett* 2009;284:1–6.
- [9] Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res* 2008;28:729–37.
- [10] Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995;235:207–19.
- [11] Kundu JK, Surh YJ. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 2008;269:243–61.
- [12] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191–6.
- [13] Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF- α . *Phytother Res* 2007;21:278–83.
- [14] André P, Renimel L, LVMH Recherche. Protecting and regenerating composition. US 2007/0243148 A1; 2007.
- [15] Maes DH, Mohammadi F, Qu L, Czarnota A, Mammone T, Declercq L, et al. Emulsion cosmetic compositions containing resveratrol derivatives and silicone surfactant. US 2009/0035237 A1; 2009.
- [16] Huang LL, Xue Z, Zhu QQ. Method for the production of resveratrol in a recombinant oleaginous microorganism. WO 2006/125000 A2; 2006.
- [17] Donnez D, Jeandet P, Clément C, Courot E. Bioproduction of *trans*-resveratrol and various stilbene derivatives in microorganisms and plant cells. *Trends Biotechnol* 2009;27:706–13.
- [18] Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 1976;9:77–86.
- [19] Schnee S, Viret O, Gindro K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol* 2008;72:128–33.
- [20] Benhamou N. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1996;1:233–40.
- [21] Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus JM, Mauch-Mani B. Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur J Plant Pathol* 2008;121:185–95.
- [22] Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M, Righetti L, Naldrett MJ, Bagni N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics* 2009;9:610–24.
- [23] Ferri M, Dipalo SCF, Bagni N, Tassoni A. Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chem* 2011;124:1473–9.
- [24] Repka V, Fischerova I, Silharova K. Methyljasmonate is a potent elicitor of a multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension culture. *Biol Plant* 2004;48:273–83.
- [25] Tassoni A, Fornalè S, Franceschetti M, Musiani F, Michael AJ, Perry B, et al. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol* 2005;166:895–905.
- [26] Belhadj A, Telef N, Saigne C, Cluzet S, Barriau F, Hamdi S, et al. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol Biochem* 2008;46:493–9.
- [27] Lijavetzky D, Almagro L, Belchi-Navarro S, Martínez-Zapater JM, Bru R, Pedreño MA. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res Notes* 2008;1:132.
- [28] Vitrac X, Monti JP, Vercauteren J, Deffieux G, Merillon JM. Carbon-14 labelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Biotechnol* 2002;95:49–56.
- [29] Bru MR, Pedreño GMLDE. Method for the production of resveratrol in cell cultures. US 2006/0205049 A1; 2006.
- [30] Aumont V, Larronde F, Richard T, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, et al. Production of highly ^{13}C -labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotechnol* 2004;109:287–94.
- [31] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473–97.
- [32] Jeandet P, Breuil AC, Adrian M, Weston LA, Debord S, Meunier P, et al. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorimetry. *Anal Chem* 1997;69:5172–7.
- [33] Gu M, Su ZG, Janson JC. One-step purification of resveratrol and polydatin from *Polygonum cuspidatum* (Sieb & Zucc.) by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose. *Chromatographia* 2006;64:701–4.

Please cite this article in press as: Donnez D, et al. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochem* (2011), doi:10.1016/j.procbio.2011.01.019



- [34] Abe M, Shibaoka H, Yamane H, Takahashi N. Cell-cycle-dependent disruption of microtubules by methyl jasmonate in tobacco BT-2 cells. *Protoplasma* 1990;156:1–8.
- [35] Breuil AC, Adrian M, Pirio N, Meunier P, Bessis R, Jeandet P. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*. 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Lett* 1998;39:537–40.
- [36] Martinez-Esteso MJ, Sellés-Marchart S, Vera-Urbina JC, Pedreño MA, Bru-Martinez R. Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *J Proteomics* 2009;73:331–41.
- [37] Mulinacci N, Innocenti M, Santamaria AR, la Marca G, Pasqua G. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of stilbenoids in cell cultures of *Vitis vinifera* L., cv. Malvasia. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:2065–73.
- [38] Yazaki K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* 2006;580:1183–91.
- [39] Fornara V, Onelli E, Sparvoli F, Rossoni M, Aina R, Marino G, et al. Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 2008;233:83–93.

Please cite this article in press as: Donnez D, et al. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochem* (2011), doi:[10.1016/j.procbio.2011.01.019](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.019)





Figure 10 : Photographies de deux différentes cultures de suspension cellulaire de *Vitis* 41B, à gauche dans une cuve de 2 L et à droite dans une cuve de 10 L.

II. Eléments d'optimisation de la bioproduction

i. Volume de culture

Dans le but d'optimiser le système de culture, les cultures en bioréacteur de 2 L ont été multipliées avec différents essais de pale d'agitation. Dans la publication 2, la sensibilité des suspensions de *Vitis* 41B vis-à-vis de la vitesse d'agitation et à une aération trop intensive a été démontrée. La diminution ces deux paramètres conduit à un brassage faible des cellules qui n'est pas compatible avec leur croissance. L'agrandissement de la taille de la pale semble alors un paramètre intéressant à développer. L'emploi d'une pale marine de diamètre plus large (8 cm) que celui utilisé classiquement dans les cuves de 2 L (6,5 cm) a montré un brassage plus important de la culture et a ainsi permis une meilleure croissance des cellules. Plusieurs essais ont pu aussi être menés avec une pale de type pitch blade de grand diamètre (10 cm) permettant une vitesse de rotation de 15 rpm au lieu des 50 rpm précédemment utilisés. Les premières expériences réalisées avec ce système montrent une absence d'accumulation de cellules aussi bien au niveau de la partie supérieure de la cuve à l'interface liquide/air, qu'en fond de cuve et limite de plus la formation d'agrégats et permet un brassage plus uniforme. Cependant, s'agissant de manipulations récentes et préliminaires, la croissance, ainsi que la production de resvératrol n'ont pas été quantifiées pour le moment dans ce système de culture.

L'augmentation des volumes de culture est un paramètre incontournable pour un développement en bioproduction. Des cultures en cuve de 10 L ont été réalisées, dans ces conditions, les cellules ont montré une croissance inférieure à celle obtenue en culture de 2 L (Figure 10). L'utilisation de ce type de bioréacteur possède une capacité de brassage limitée dans le cas de culture végétale. L'optimisation de la culture semble s'accompagner de la recherche d'un type de bioréacteur plus performant. L'utilisation de type colonne à bulle par exemple pourrait permettre l'optimisation de la culture car cette configuration éviterait l'utilisation de pales d'agitation.



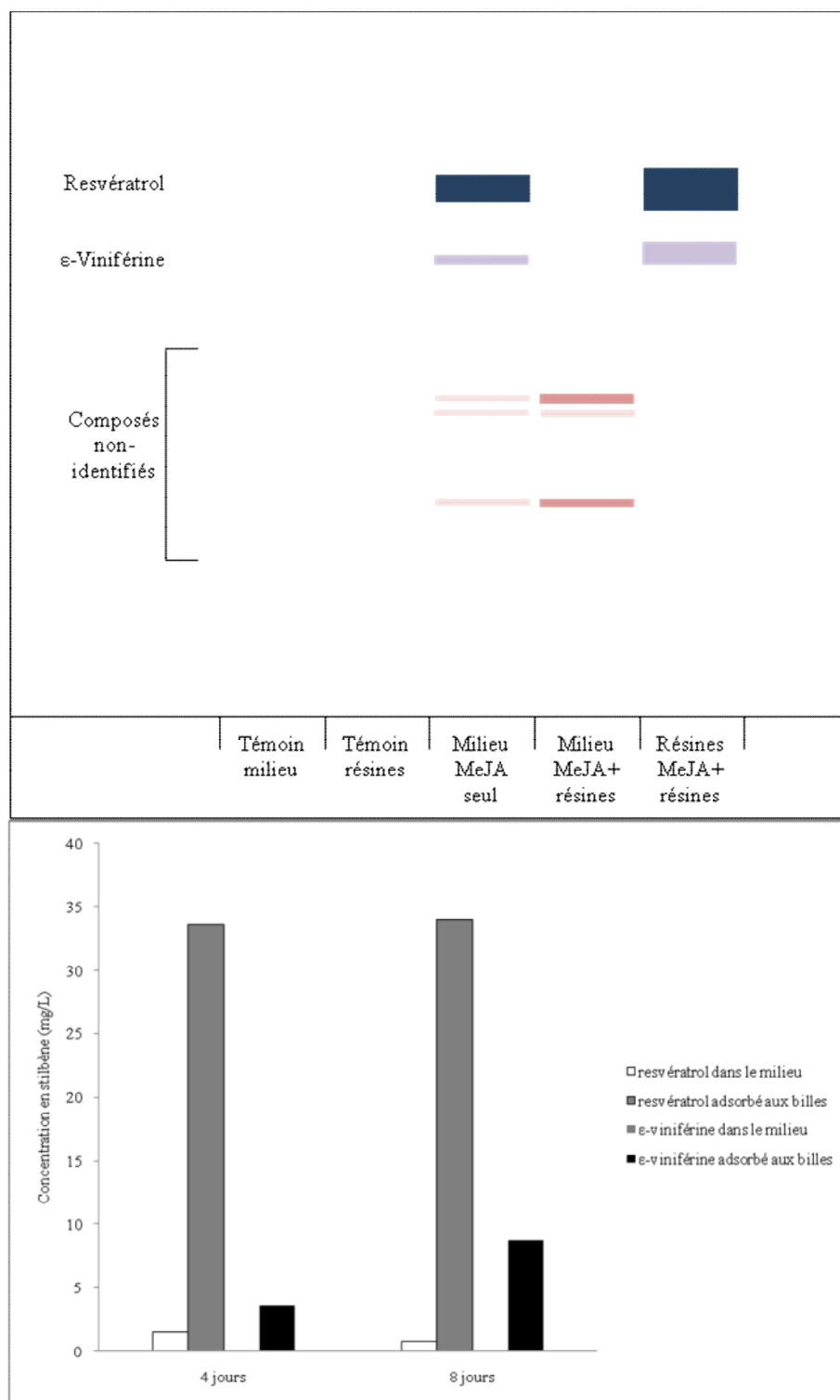


Figure 11 : résultats préliminaires présentant l'effet de l'utilisation de billes de résine Amberlite XAD16 lors de l'élicitation au MeJA (0,2mM) des suspensions cellulaires de *Vitis* 41B.

A : schéma du chromatogramme couche mince obtenu 96 heures après l'élicitation en présence ou non de résine.

B : effet des billes de résine sur la production de resvératrol et d'ε-viniférine et leurs conservations au cours du temps.

ii. Adsorption du resvératrol

Les cyclodextrines permettent non seulement d'induire la production de resvératrol mais aussi de protéger celui-ci contre sa métabolisation dans le milieu (Donnez *et al.*, 2009). L'utilisation des cyclodextrines a permis d'obtenir des quantités de resvératrol supérieures à 2 g/L de culture (Bru et Pedreno, 2006). De plus l'isolement du resvératrol du milieu de culture peut limiter son contact avec les cellules et ainsi supprimer son adsorption au niveau des parois et même sa réabsorption dans la cellule. Si un mécanisme de rétro contrôle de la biosynthèse du resvératrol existe, celui-ci peut également être inhibé.

Nous avons développé différentes techniques afin de mimer l'effet des cyclodextrines (Tableau 2). Dans un premier temps, nous avons réalisé une culture en fed-batch, mais le problème est de soutirer le milieu sans prélever les cellules et ceci sans équipement particulier. C'est pourquoi nous avons envisagé l'ajout dans la culture de substance capable d'isoler le resvératrol. Nous avons testé l'acétate d'éthyl (AcOEt), qui est le solvant utilisé pour l'extraction du milieu, celui-ci est apparu comme plutôt prometteur. Le solvant piège le MeJA, ce qui évite son contact avec les cellules. L'AcOEt doit donc être ajouté après l'éllicitation. Ces manipulations n'ont pu être poursuivies par crainte d'émission de vapeurs du solvant dans la pièce de culture et par le risque représenté par sa présence en quantité lors de la réalisation potentielle de cinétiques. Il apparaîtrait souhaitable de développer un système de contenants plus étanches pour ce type d'expérience.

Nous avons ensuite conduit des essais à l'aide de deux types de résines, des Séphadex (résine de gel filtration) et des Amberlites (résines échangeuses d'ions), dans l'optique d'adsorber le resvératrol. Dans le cas de la Séphadex, nous l'avons introduite dans un boudin de dialyse. Ce boudin a alors été placé dans une fiole de culture. Le problème est que celui-ci gêne le brassage de la suspension et provoque une perte de viabilité. Nous avons ensuite envisagé l'emploi de bille de résine Amberlite XAD1600. Les billes ont été ajoutées directement dans la culture. Les résultats obtenus montrent que la quantité de resvératrol est augmentée dans le cadre de l'ajout des billes couplé à une éllicitation avec du MeJA à 0,2 mM (Figure 11). Ces résines permettent également la préservation du resvératrol. En effet, aux deux temps de cinétique à 4 et 8 jours, sa quantité est restée stable à l'instar de ce qui avait été décrit pour les cyclodextrines. La limite à l'utilisation de ces résines est la difficulté de séparation des billes et des cellules en fin de culture. En effet, la taille et la masse des billes et des cellules sont très proches ce qui rend la séparation compliquée. La mise en place d'un



compartiment permettant d'isoler les cellules des résines serait à envisager pour continuer à travailler sur ce type d'approche.

III. Effet du chitosan sur le modèle de culture

Au niveau des éliciteurs testés (Tableau 2), le chitosan est apparu comme une molécule présentant des propriétés intéressantes. En effet, cette molécule a été décrite sur vitroplants de vigne comme capable d'induire les défenses de la plante mais également de promouvoir sa croissance (Ait Barka *et al.*, 2004). Ces propriétés peuvent constituer un avantage pour la culture de suspensions cellulaires en vue d'une bioproduction. L'élicitation par le MeJA semble induire une mort cellulaire. Deux hypothèses principales peuvent être émises pour expliquer ce phénomène : (i) le MeJA est toxique et bloque la croissance cellulaire (Abe *et al.*, 1990), (ii) le resvératrol accumulé en grande quantité, suite au traitement par le MeJA, a un effet toxique sur les cellules. Une molécule, comme le chitosan, dont certaines concentrations stimulent la croissance en même temps qu'elles induisent de la synthèse de stilbènes, est apparue comme intéressante à tester sur les cellules 41B. Au cours de la publication 3, les résultats de manipulations réalisées dans le but d'étudier l'effet du chitosan sur la croissance cellulaire et sur la production de stilbènes, seul ou en synergie avec le MeJA, sont présentés.



**Publication 3 : Effect of chitosan and
methyljasmonate on resveratrol and ϵ -
viniferin productions in a grapevine cell
suspension**



Effect of chitosan and methyljasmonate on resveratrol and ϵ -viniferin productions in a grapevine cell suspension

David Donnez^a, Alexandra Conreux^b, Barbara Courteaux^a, Philippe Jeandet^b, Essaïd Aït-Barka^a, Christophe Clément^a and Eric Courot^{a*}

^a Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Unité de Recherche « Vigne et Vins de Champagne – Stress et Environnement », EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims cedex 02, France

^b Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, Unité de Recherche « Vigne et Vins de Champagne – Stress et Environnement », EA 2069, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims cedex 02, France

* Corresponding author. Tel: +33 3 26 91 34 41/ Fax: +33 3 26 91 34 27

E-mail address: eric.courot@univ-reims.fr (E. Courot)

Abstract

A grapevine cell suspension has been previously described for its ability to produce stilbenes under MeJA elicitation in flasks and in a 2L bioreactor. In order to counterbalance growth inhibition obtained with MeJA and putatively enhance the stilbene production, cells were cultured in presence of chitosan, a potential growth-promoter and/or elicitor. Results show that only the concentration 0.01 g/L of chitosan was able to promote cell growth ($\times 1.5$) but not stilbene synthesis. Coupling chitosan with MeJA did not affect the production levels and time courses of both resveratrol and ϵ -viniferin compared to MeJA alone as elicitor. Furthermore, results clearly show that ϵ -viniferin formation is related to resveratrol metabolism, as revealed by the kinetic of production. In the other hand, our results show that chitosan remains a complex molecule to be used in bioproduction.



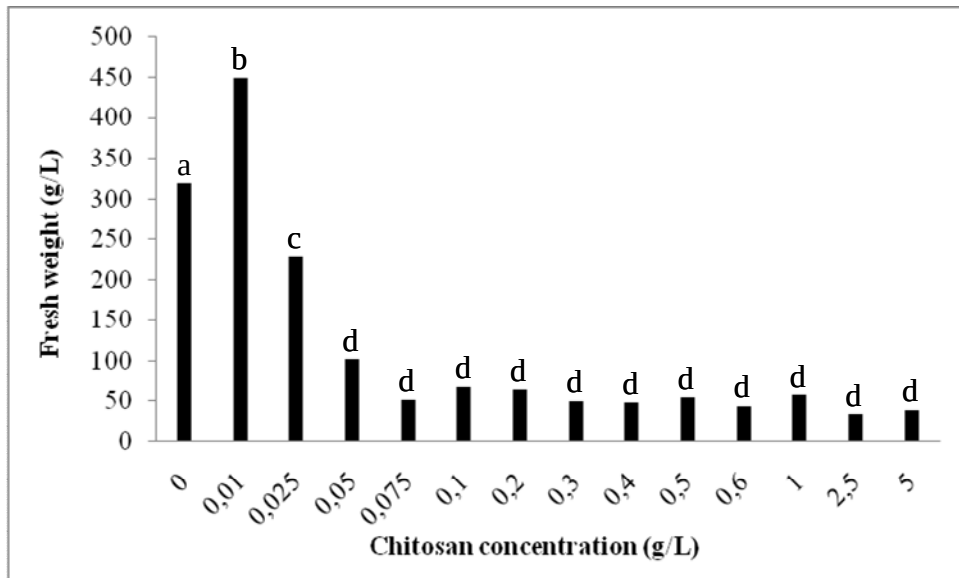


Figure 1: Effect of various chitosan concentrations on cell growth (from 0 to 5 g/L after 7 days of incubation). Significance of differences was analyzed using a two-tailed Student's t-test with $p < 0.05$ as significant.

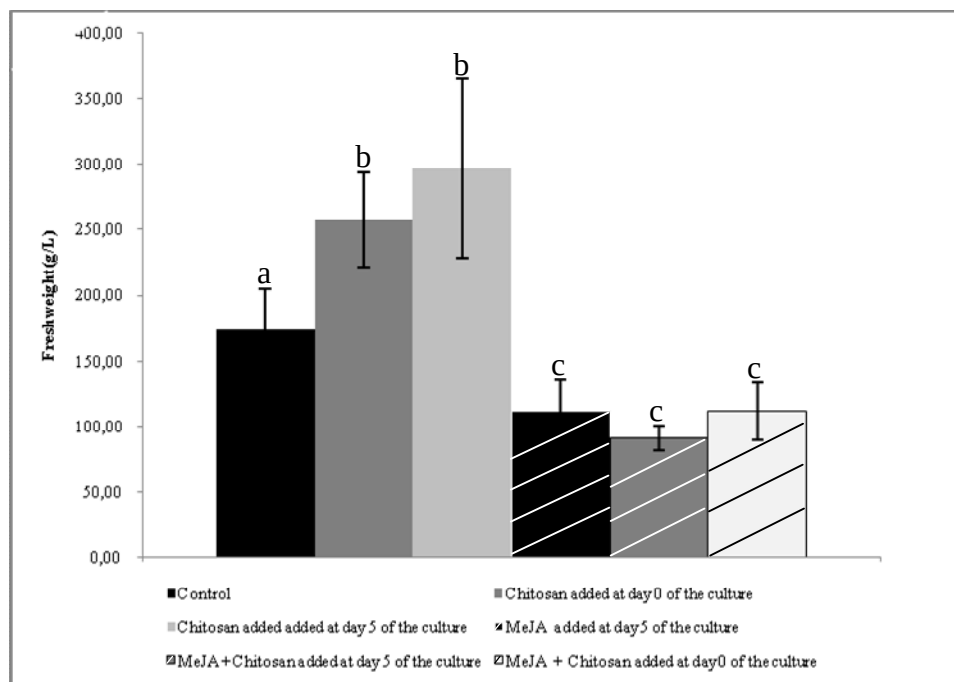


Figure 2: Effect after 9 days of a 0.01 g/L chitosan concentration on cell growth. Chitosan was introduced during cell subculture or 5 days after and with or without addition of MeJA at the day 5. Significance of differences was analyzed using a two-tailed Student's t-test with $p < 0.05$ as significant.

Introduction

Resveratrol, *trans*-3-5-4'-trihydroxy-stilbene, is a grape phytoalexin involved in many biological studies for its activities against cancer, heart diseases or diabetes (Frankel *et al.*, 1993 ; Pillarisetti, 2008 ; Kundu et Surh, 2008). The main source of resveratrol remains *Polygonum cuspidatum* root extracts, especially for nutraceutical industry. Despite this, and considering the need for sustainable processes, new sources of resveratrol are studied such as bioproduction using microorganisms and plant cells (Donnez *et al.*, 2009). In particular, grapevine cell cultures represents a valuable system to produce not only resveratrol, but also derivatives used in the cosmetic industry like viniferins (Donnez *et al.*, 2010). Elicitation remains the more interesting way to stimulate secondary metabolite production in cell cultures and the choice of the elicitor(s) represents a challenge to optimize cell response. As an example, JA and its methyl derivative MeJA are elicitors currently used in cell cultures. In grapevine cultures, MeJA was shown to provoke a large inhibition of cell growth of different cell lines (Ferri *et al.*, 2009; Donnez *et al.* 2010), phenomenon that could be a problem for the level of stilbene production and cell viability. Experiments performed on *in vitro* plantlets of grapevine in the presence of chitosan added in the culture medium, led to enhance plant growth, as revealed by a faster development of roots and leaves (Ait Barka *et al.*, 2004). Chitosan has also been described as an elicitor, able to increase defense enzyme activities, such as PAL and PR-proteins (chitinases, glucanases) (El Ghaouth *et al.* 1994; Trotel-Aziz *et al.*, 2006) or to enhance stilbene synthesis (Ferri *et al.*, 2009; Ferri *et al.*, 2011). Our objective was to culture our *Vitis* 41B cell suspension in presence of chitosan in order to study its action on cell growth in relation with stilbene production, in absence or in presence of MeJA. To our knowledge, it is the first time that a kinetic of both resveratrol and ϵ -viniferin synthesis is presented using grape cell cultures.

Results

In order to study the role of chitosan on cell growth, different concentrations of chitosan (0 to 5 g/L) were added at d0 of culture and the fresh weight of the *Vitis* 41B cells was evaluated after 7 days of incubation (Figure 1). The results obtained showed a growth slowdown with a chitosan concentration of 0.025 g/L and a large growth inhibition with concentrations higher to 0.05 g/L in regard with the control without chitosan. By contrast, the growth was increased by a 1.5 factor when cells were cultured in presence of 0.01 g/L



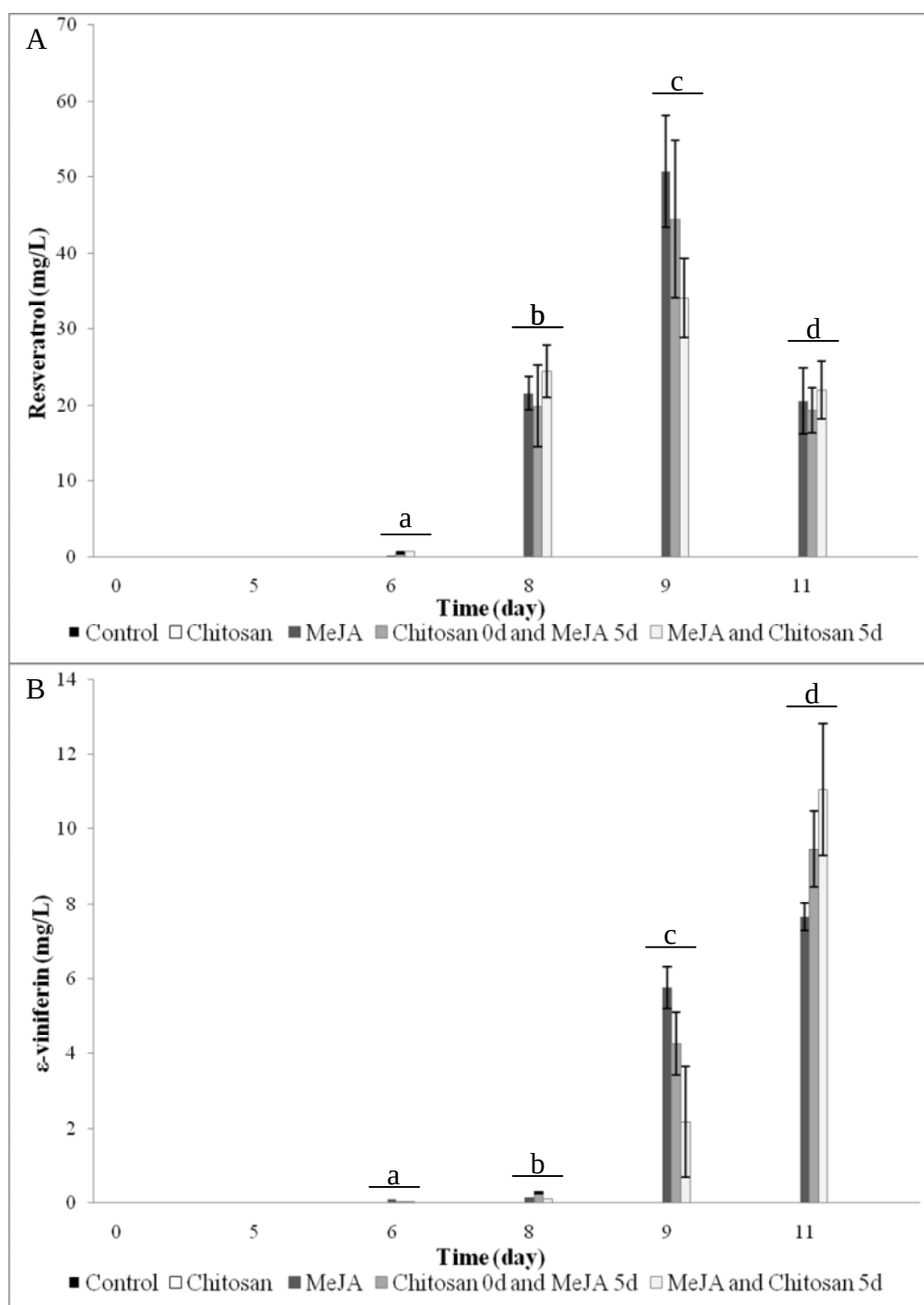


Figure 3: Effect of chitosan and MeJA alone or together on the resveratrol (A) or ε-viniferin (B) production. Significance of differences was analyzed using a two-tailed Student's t-test with $p < 0.05$ as significant.

chitosan. This concentration was then used for the measurement of stilbenes. The stilbene production was only monitored in the culture medium since 90% of the resveratrol production in 41B cells was excreted (Donnez *et al.*, 2010). After the analysis of the chitosan treated culture, no stilbene was detected in the medium, as in control cells.

As previously described (Donnez *et al.*, 2010), the *Vitis* 41B cells showed the ability to produce a large amount of resveratrol when they are treated with 0.2 mM MeJA, concurrently to an inhibition of cell growth. In order to increase cell productivity, chitosan (0.01 g/L) was used in addition to the MeJA elicitor in order to trigger the biomass and/or the resveratrol production. The cell FW obtained after 9 days of culture was higher when chitosan was added at d5, reaching 300 g/L but the result was not significantly different from an addition of chitosan at d0 of the culture (Figure 2). The addition of MeJA led to an inhibition of cell growth, alone or in association with chitosan, as confirmed by monitoring the FW of the cells during 9 days (Figure 2). Concerning stilbene production, the two chitosan timings showed the same profiles. First, maximal production of resveratrol was obtained 96 h after elicitation of MeJA (d9) (Figure 3A), confirming our previous results (Donnez *et al.* 2010). Then a decrease of resveratrol was obtained, that could be correlated with an increase of ϵ -viniferin production (Figure 3B). These results seem indicate that resveratrol was transformed into viniferins (Donnez *et al.* 2010). This phenomenon could be related to the action of peroxydases found in the medium of culture, as suggested by Martinez-Esteso *et al.* (2009), in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures. Chitosan had no effect on stilbene production in these conditions (Figure 3) since no enhancement of their quantity, nor no alteration of their kinetics were observed. Results obtained with MeJA added alone or for MeJA coupled with chitosan were significantly the same for each point of the kinetics.

Discussion

The goal of this work was to find an inducer able to both increase stilbene production and/or promote a biomass increase, in order to counterbalance growth inhibition observed with MeJA. In our conditions, only the concentration of 0.01 g/L chitosan was able to lightly increase the growth of *Vitis* 41B cell suspension but no induction of stilbene synthesis was obtained. These results reinforced results obtained with *in vitro* plantlets of grapevine showing a better growth (Ait Barka *et al.*, 2004), but are in opposition with the use of 0.05 g/L chitosan on *Vitis vinifera* cv Barbera cell suspension, in which no increase of growth was recorded (Ferri *et al.*, 2009). This effect on growth was not described in other studies where



chitosan was described as a potential inducer of defenses (Kauss *et al.*, 1989 ; Conrath *et al.*, 1989 ; Zhang *et al.*, 2000) including resveratrol production (Ferri *et al.*, 2009).

A synergistic effect between chitosan and other molecules such as MeJA, was already shown on cell suspension of *Taxus* for the production of paclitaxel (Zhang *et al.*, 2000). This effect was not recovered for resveratrol synthesis using *Vitis* 41B cell suspensions. Furthermore, it appeared that the kinetics of stilbene synthesis were not modified with or without chitosan. Resveratrol production remained higher 96 h after elicitation and production of viniferin followed resveratrol decrease, suggesting that resveratrol may be metabolized into viniferins.

This work underlines that the use of chitosan as a growth promoter or elicitor is clearly dependent of the plant system used; *i.e.* plantlets, or cell culture strains. Furthermore, the polymerization degree and the deacetylation percentage of chitosan could be different depending on the preparation of the chitosan solution, and these differences could have important consequences on chitosan properties (Kauss *et al.*, 1989). The chitosan ability to increase the biomass without induction of resveratrol synthesis may be an interesting property for a two stage culture with a first step of culture consisting in increasing the biomass in a medium supplemented with chitosan, followed by a second step where MeJA is introduced in order to induce the resveratrol synthesis.

Nevertheless, chitosan appeared as a complex molecule and its use has to be standardized by using well-defined chitosan solutions in order to better characterize its various biological effects. Furthermore, the obtention of ϵ -viniferins in the culture medium would lead to study mechanisms involved in the metabolization of resveratrol into more complex structures.

Materials and methods

Cell culture

Flask experiments were conducted with a rootstock *Vitis* 41B cell suspension (*Vitis vinifera* cv. Chasselas x *Vitis berlandieri*) as previously described (Donnez *et al.*, 2010). Cell growth and production time courses were conducted in triplicate by introducing 10 g of fresh filtered cells in 300 mL flasks containing 90 mL of MS medium.



Preparation of the chitosan solution

Shrimp shell chitosan was purchased from Sigma Aldrich (France) and ground to a fine powder. Purified chitosan was prepared by dissolving chitosan in 0.25 N acetic acid, and the undissolved particles were removed by centrifugation (15 min, 10000g). The viscous solution was then neutralized with 2.5 N NaOH to pH 9.8 to precipitate the chitosan. Precipitated chitosan was recovered by filtration, washed extensively with deionized water, and then lyophilized. Chitosan stock solution (10 mg/mL) was prepared by dissolving chitosan in 0.05 N HCl, and the pH solution was adjusted to 5.6 by adding sodium hydroxide 1N. The stock solution was autoclaved and subsequently added to sterile, distilled water to obtain desired final chitosan concentrations of 2, 4, 6, and 8 mg/mL.

Treatments with chitosan and MeJA

To study the role of chitosan on cell growth, chitosan was added at d0 of the culture in the culture medium. A range of concentrations between 0 g/L to 5 g/L was investigated. For each concentration, manipulation was conducted three times in triplicate.

Concerning the putative elicitor effect of chitosan, two different experiments were monitored, the first consisting to introduce the chitosan (10 mg/L) in culture medium at d0 and the second at d5. In order to determine a synergistic effect with MeJA, the same timing than the one described before was used, and 0,5 mL of a solution of MeJA (Sigma) in 50% EtOH (40 mM) was added at day 5 to obtain the final concentrations of 0.2 mM. Controls were realized by addition of the same volume of ethanol without MeJA for the flask experiment. Cell growth and resveratrol production were followed until day 11. Experiments were realized in triplicate.

Stilbene extraction

Stilbene production was only analyzed in the culture medium since close to 90% of the resveratrol produced is excreted (Donnez *et al.*, 2010). Medium and cells were filtered under reduced pressure and the medium was stored at -20°C until extraction. After thawing, medium was washed by the same volume of AcOEt and the organic phase was evaporated to dryness using a rotavapor (Laborata 4000 Efficient, Heidolph). The concentrate was resuspended in 1 mL of MeOH.



HPLC analysis

Ten microliters of the methanolic extracts were injected onto a Waters Spherisorb C18 S50DS2 4 HPLC column (6x250 mm). The HPLC system used was a Waters apparatus equipped with a 510 pump, a 600 gradient controller, a 717 automatic sampler thermostated at 4°C and a 2487 UV-visible detector. Elution solvents were A: CH₃CN (Acros Organics) and B: H₂O (Direct Q5 Millipore). The gradient performed was the same as used by Jeandet *et al.* (1997). UV detection was monitored at 285 and 307 nm. Resveratrol standard was from Sigma and ε-viniferin from Actichem.

References

- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects vitis vinifera L. against botrytis cinerea. *Plant Cell Reports*, 22(8), 608-614.
- Conrath, U., Domard, A., & Kauss, H. (1989). Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8(3), 152-155.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 27(12), 706-713.
- Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2010). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, submitted.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., & Belanger, R. (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of pythium aphanidermatum and induction of defense reactions. *Phytopathology*, 84(3), 313-320.
- Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M. J., & Bagni, N. (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in vitis vinifera cell suspensions. *Proteomics*, 9(3), 610-624.
- Ferri, M., Dipalo, S. C. F., Bagni, N., & Tassoni, A. (2011). Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chemistry*, 124(4), 1473-1479.



Kauss, H., Jeblick, W., & Domard, A. (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178(3), 385-392.

Martinez-Esteso, M. J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J. C., Pedreño, M. A., & Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73(2), 331-341.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 405-413.

Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L., & Yu, L. J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 22(19), 1561-1564.



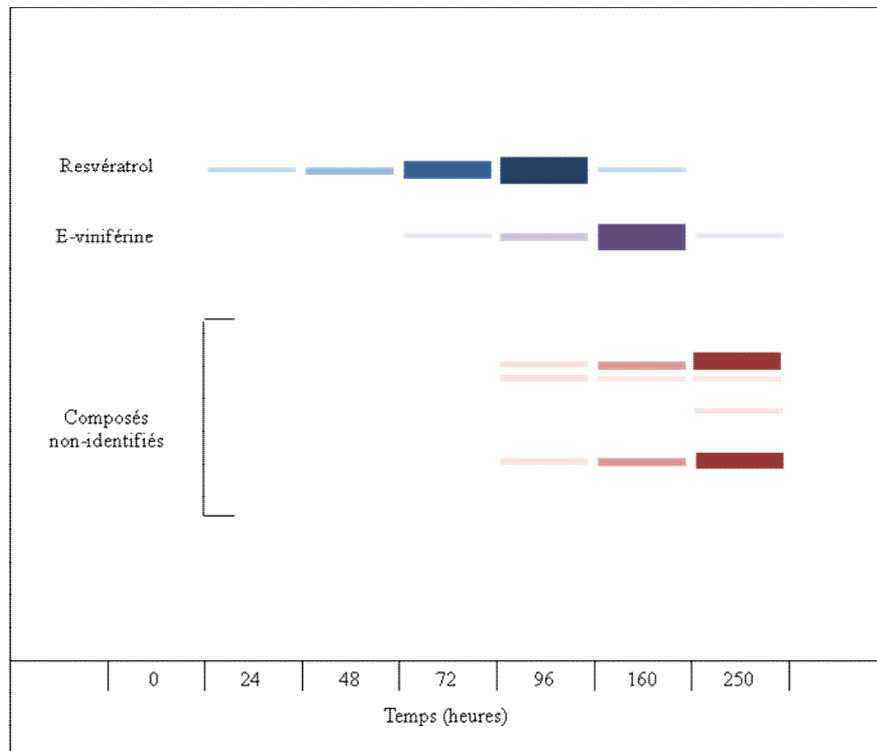


Figure 12 : Schéma d'une chromatographie en couche mince représentant l'analyse des stilbènes des prélèvements à des temps différents après élicitation au MeJA (0,2 mM) de milieu de culture de suspension cellulaire de *Vitis 41B*.

IV. Accumulation du resvératrol et métabolisation

La production de resvératrol est induite de manière transitoire. En effet, il est excrété dans le milieu au cours des 4 jours suivant l'éllicitation pour atteindre son pic d'accumulation maximum au quatrième jour. Ensuite sa quantité diminue rapidement (Figure 12) et les oligomères apparaissent avec une accumulation maximale en ϵ -viniférine 7 jours après l'éllicitation (Figure 12). Un parallèle entre la disparition du resvératrol et l'apparition de formes oligomériques au niveau du milieu de culture peut être envisagé. La formation des viniférines semble être réalisée par une dimérisation liée à l'action de peroxydases en présence de H_2O_2 . De telles enzymes ont été récemment décrites comme pouvant être excrétées par des cellules de vigne en suspensions (Martinez-Esteso *et al.*, 2009). La publication 1 fait référence à des suspensions cellulaires de vigne capables de synthétiser plusieurs grammes de resvératrol dans le cas d'une éllicitation à l'aide de cyclodextrines (Bru et Pedreno, 2006). Cet élliciteur est connu pour sa capacité à induire la synthèse de métabolites secondaires, mais il a été aussi décrit comme ayant la propriété de protéger le resvératrol à l'intérieur de sa structure (Lucas-Abellán *et al.* 2008). Cette protection limite l'oxydation du resvératrol ainsi que son oligomérisation. L'arrêt de l'accumulation du resvératrol est un phénomène intéressant d'autant plus que les oligomères ont une accumulation jusqu'à un maximum, suivi d'une diminution de leur quantité (Figure 12). L'hypothèse d'une rétro inhibition de la synthèse du resvératrol liée à son accumulation semble cohérente avec l'arrêt de sa synthèse après 4 jours. Toutefois, l'arrêt de cette synthèse observée 4 jours après l'éllicitation dans notre système pourrait être lié également à la mort cellulaire (Tassoni *et al.*, 2005). Ces deux hypothèses ne semblent pas être en relation avec ce qui a été observé au niveau des suspensions élicitées par les cyclodextrines, où le resvératrol est bloqué. Malgré cela l'accumulation maximale est aussi obtenue 4 jours après éllicitation.



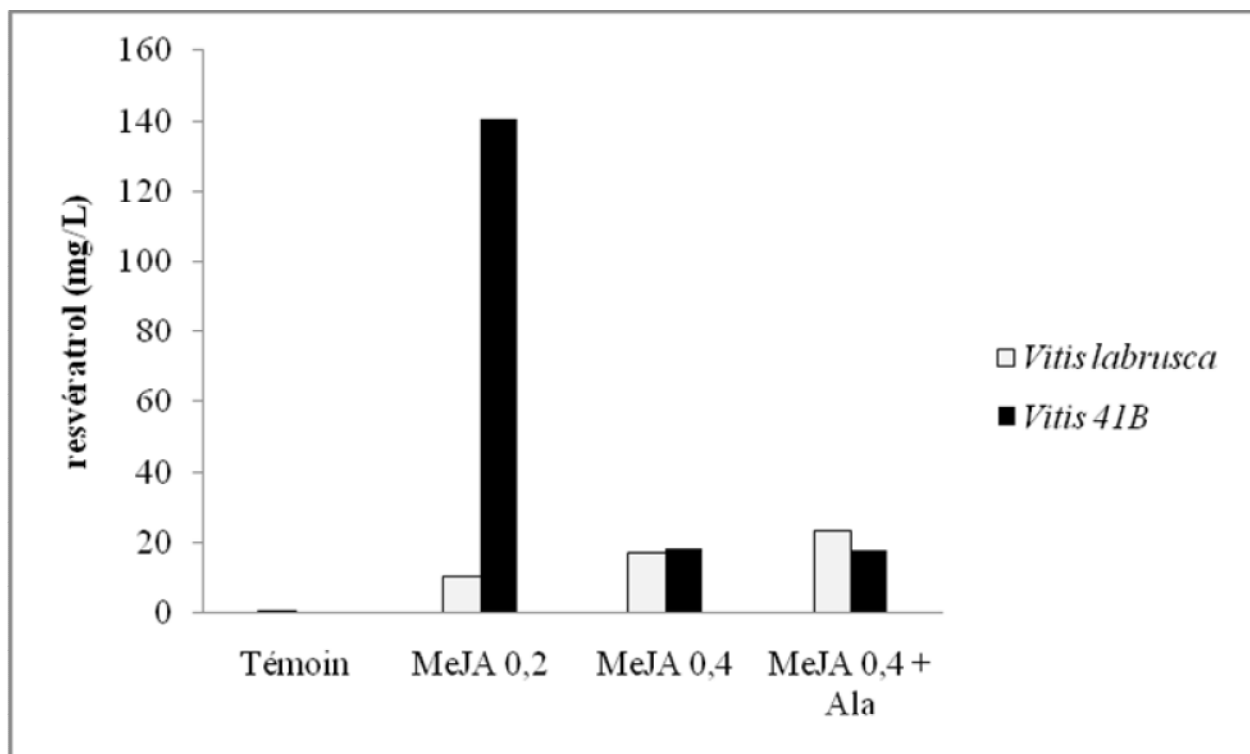


Figure 13 : Comparaison de la production de resvératrol des suspensions cellulaires de *V. labrusca* et de 41B suite à un traitement au MeJA aux concentrations de 0,2 et 0,4 mM seul ou avec l'ajout d'alanine à une concentration de 50 mg/L.

V. Comparaison des propriétés des suspensions cellulaires de *Vitis 41B* et de *Vitis labrusca* cv. Concord

Pour démontrer les variations qui existent au niveau de la réponse aux éliciteurs les suspensions de *Vitis 41B* ont été comparées à des suspensions de *Vitis Labrusca* cv. Concord. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration au cours d'un séjour de quatre mois au sein du laboratoire du professeur Vincenzo de Luca à Brock university (Ontario, Canada)*.

Ce laboratoire avait développé une suspension cellulaire de vigne répondant à une élicitation à l'alanine (Chen *et al.*, 2006). Des tests d'élicitation ont donc été réalisés pour observer l'effet du MeJA et de l'alanine seul ou en synergie sur les deux types de suspension.

Ces deux suspensions ne présentent pas de synthèse de stilbène en condition témoin, curieusement, l'alanine introduite seule n'a pas induit la synthèse des stilbènes chez les deux souches cellulaires (Figure 13). Le MeJA en revanche a permis l'obtention de resvératrol au niveau des deux différentes suspensions. De la même manière que pour la culture de 41B, les suspensions de *V. labrusca* excrètent majoritairement le resvératrol dans le milieu. Au niveau de l'effet dose de MeJA, la concentration de 0,2 mM a été confirmée pour une élicitation des cellules de 41B, mais chez les cellules de *V. labrusca* la concentration optimale est de 0,4 mM. De plus, un effet synergique entre cette concentration de MeJA et d'alanine 50 mg/L (Chen *et al.*, 2006) a été observé pour les suspensions de *V. labrusca* (Figure 13). Toutefois, cette synergie permet d'augmenter le niveau de production de resvératrol de cette culture sans pour autant égaler la production des cellules de 41B (Figure 13).

Des différences importantes dans le niveau de production et dans les conditions d'induction de la synthèse des stilbènes semblent donc exister d'une suspension cellulaire à une autre. Cela explique la difficulté d'adaptation et de généralisation des techniques d'élicitation.

* Ce séjour a fait l'objet d'un financement de l'Ontario Centre of Excellence (OCE).



VI. Conclusion

La suspension cellulaire de *Vitis 41B* élicitée par une solution de MeJA s'est avérée être un système intéressant pour l'étude de la biosynthèse des stilbènes. Ce système cellule-éliciteur est un modèle reproductible permettant l'obtention de resvératrol et de certains autres stilbènes, comme l' ϵ - et la δ -viniférine, jamais décrits jusqu'à présent en culture en bioréacteur. Par cette singularité et par la quantité de stilbènes produits, l'utilisation de ce système pour la bioproduction pourrait être envisagée. En effet, les cellules 41B présentent une cinétique de croissance rapide pour un système végétal, une bonne adaptation aux conditions de culture en bioréacteur et un système d'excrétion permettant l'extraction des molécules dans le milieu de culture. Contrairement aux autres systèmes de suspensions cellulaires de vigne décrits dans la bibliographie (Donnez *et al.*, 2009), la suspension cellulaire de *Vitis 41B* ne présente pas d'accumulation de stilbènes de manière constitutive et peut présenter une oligomérisation du resvératrol après induction de sa synthèse. Ce système se définit donc comme un modèle intéressant dans l'étude fondamentale des mécanismes cellulaires qui régissent la synthèse, le transport et l'oligomérisation du resvératrol. Ces mécanismes sont actuellement très peu documentés au niveau de la bibliographie.



Partie 2 : cinétique d'apparition du resvératrol, localisation de sa synthèse et mécanismes d'excrétion.



I. Introduction

La compréhension des mécanismes cellulaires liés à la synthèse du resvératrol apparaît comme fondamentale pour mieux appréhender la défense de la vigne. En effet, cette molécule a été décrite comme étant fortement liée à la résistance ou à la sensibilité de différents cépages (Schnee *et al.*, 2008). La relation entre la quantité de resvératrol synthétisé et la tolérance vis-à-vis de *Botrytis cinerea* a été démontrée *in vitro* chez le porte-greffe 41B génétiquement modifié (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Toutefois, la quantité de resvératrol ne serait pas l'unique facteur impliqué pour expliquer la résistance. En effet, la cinétique d'apparition, la localisation et la différenciation en dimères ou en picéides du resvératrol sont des paramètres qui influencent aussi la résistance et la sensibilité d'un cépage (Schnee *et al.*, 2008).

i. Cinétique d'apparition du resvératrol

La cinétique d'apparition du resvératrol qui a pu être déterminée actuellement est basée sur l'accumulation d'ARNm de la STS au niveau des cellules suite à l'élicitation et sur l'analyse par HPLC de l'accumulation du resvératrol (Jeandet *et al.*, 2010).

1. Accumulation des ARNm de la STS

Les ARNm de la STS sont accumulés en deux vagues successives. Selon les espèces, la première intervient de 6 à 12 heures après l'élicitation et la seconde suit quelques heures après (Jeandet *et al.*, 2010). Il est difficile d'évaluer le temps nécessaire séparant l'induction des ARNm et l'obtention du resvératrol, mais ce mécanisme n'est pas instantané. Le resvératrol ne serait accumulé et ne pourrait participer à la défense de la plante que plusieurs heures après la reconnaissance d'un pathogène, laissant à celui-ci le temps de se développer.

Des travaux récents sur la localisation de la STS ont montré que cette enzyme était chez la vigne présente de manière constitutive au niveau de tous les organes de la plante, même si ces organes n'accumulent pas de resvératrol de manière constitutive (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Trois mécanismes complémentaires interviendraient alors après induction des défenses : une activation de la STS présente constitutivement ou une réorganisation



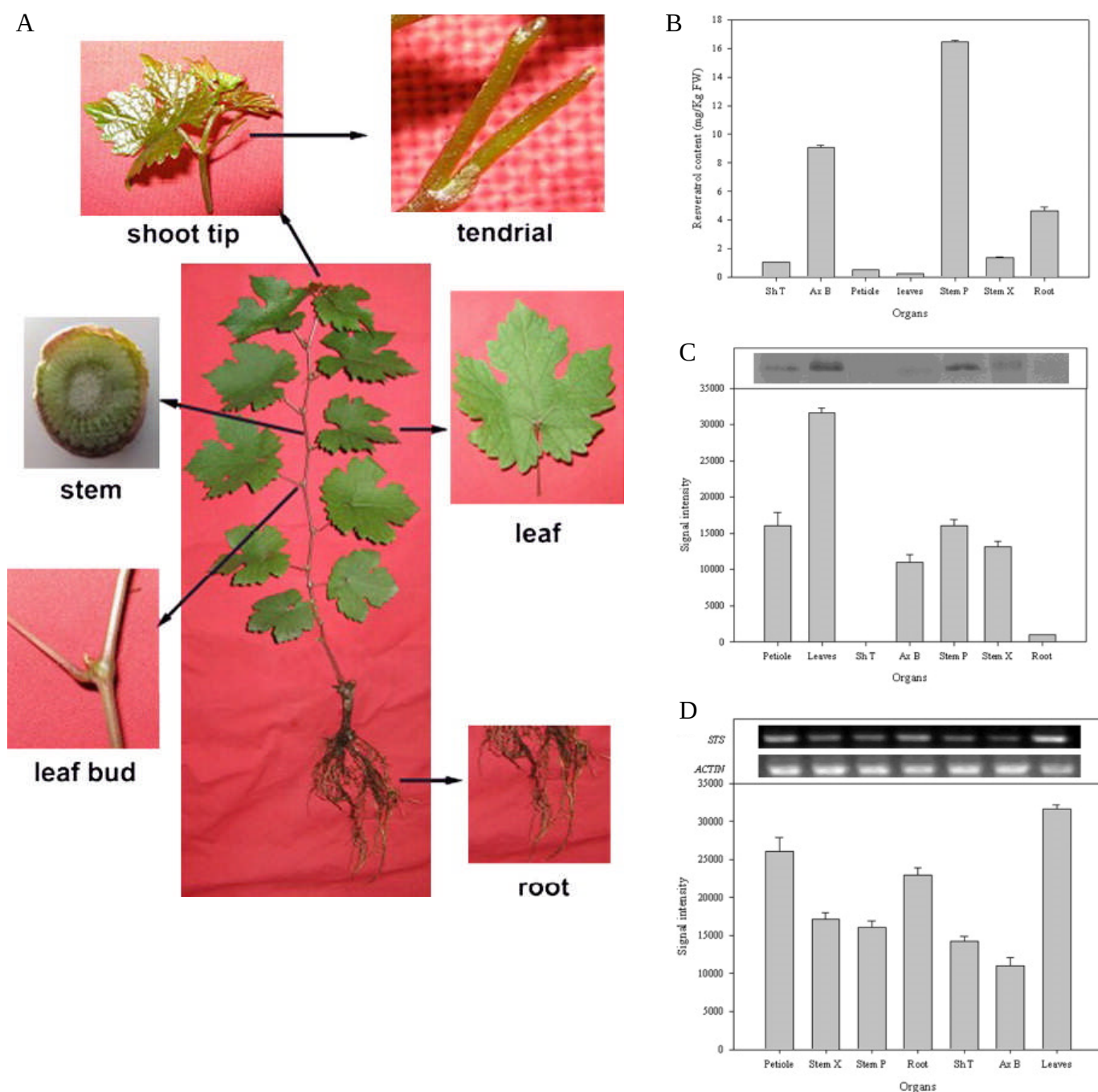


Figure 14 : Variation du niveau de resvératrol et de stilbène synthase dans différents organes d'une plantule de vigne. A : Présentation des différents parties de la plante considérés lors de cette expérience : la partie apicale (shoot tip = Sh T), le bourgeon axillaire (axillary bud = Ax B), le pétiole (petiole), la feuille (leaf), le phloème de la tige (stem phloem = Stem P), le xylème de la tige (stem xylem = Stem X) et la racine (root). B : Contenu en resvératrol dans ces différentes parties. C : Analyse en Western blot de la quantité de STS dans ces différentes zones. D : Analyse en RT-PCR de l'expression des STS dans ces différents organes. D'après Wang *et al.*, 2010.

de la distribution en resvératrol ainsi qu'une induction de l'expression des gènes dans le but d'obtenir une plus grande quantité d'enzyme. Cette hypothèse permettrait une synthèse rapide de resvératrol et la défense serait renforcée plus tardivement par l'activation des enzymes produites *de novo* (Wang *et al.*, 2010).

2. Analyse en HPLC de l'accumulation du resvératrol

L'analyse par HPLC d'extraits de feuilles montre que le resvératrol est accumulé 20 heures après l'induction des défenses (Jeandet *et al.*, 2010). L'HPLC nécessite une préparation des échantillons passant par plusieurs étapes d'extraction. De plus, cette technique ne permet que de réaliser la quantification d'une accumulation à un instant précis et sur une quantité d'échantillon relativement importante, de l'ordre de quelques dizaines de mg de biomasse. Il est alors impossible d'obtenir une cinétique précise et continue de l'apparition du resvératrol au niveau cellulaire. Toutefois des travaux récents réalisés sur des feuilles de plantules de vigne ont montré l'apparition d'une faible quantité de resvératrol dans les 8 heures suivant l'induction par les UV (Wang *et al.*, 2010).

ii. Localisation de la synthèse du resvératrol

Dans le but de déterminer la localisation de la synthèse de resvératrol chez la vigne, les STS ont été recherchées par marquage immunologique. Des anticorps anti-STs marqués ont alors permis de localiser les zones où les STS étaient présentes au niveau de la plante mais aussi à l'échelle cellulaire.

1. Localisation dans la plante

Les STS sont retrouvées principalement de manière constitutive dans les vaisseaux conducteurs de la tige, dans les bourgeons axillaires, dans les pétioles et les limbes foliaires (Figure 14) (Wang *et al.*, 2010). La présence du resvératrol a été mise en évidence au niveau des racines, des bourgeons axillaires et surtout du phloème de la tige (Figure 14). Cette observation pourrait alors être expliquée par un mécanisme de transport qui permettrait l'excrétion du resvératrol par les cellules productrices vers le phloème. Le resvératrol serait



ensuite transporté par le phloème et distribué au niveau des différents organes et en particulier vers la tige et la racine (Wang *et al.*, 2010).

2. Localisation cellulaire

La localisation des STS au niveau cellulaire a été discutée au cours de l'introduction générale. Les STS sont présentes en particulier dans le cytoplasme sous forme libre ou dans des vésicules et dans la paroi principalement (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010) mais elles ont été identifiées également au niveau de l'enveloppe du noyau et dans la vacuole (Wang *et al.*, 2010).

iii. Propriétés du resvératrol

Comme nous venons de le décrire, c'est essentiellement par une localisation des STS que la biosynthèse du resvératrol a été décrite au sein des cellules donc de façon indirecte. Cependant, les stilbènes et le resvératrol, notamment, possèdent des propriétés optiques particulières. En effet, ces molécules ont la caractéristique d'émettre une fluorescence quand elles sont excitées par une lumière UV. Le spectre des différents stilbènes est très proche mais il varie en longueur d'onde et en intensité. Cette propriété optique est utilisée dans le dosage des stilbènes par HPLC ou leur suivi en FPLC (Donnez *et al.*, 2010). Egalement employée pour la détection des stilbènes de manière macroscopique sur feuille ou baies (Petit *et al.*, 2009), ou par microscopie optique à épifluorescence au niveau cellulaire (Donnez *et al.*, 2010), cette fluorescence pourrait représenter un moyen d'étude *in vivo* très sensible.



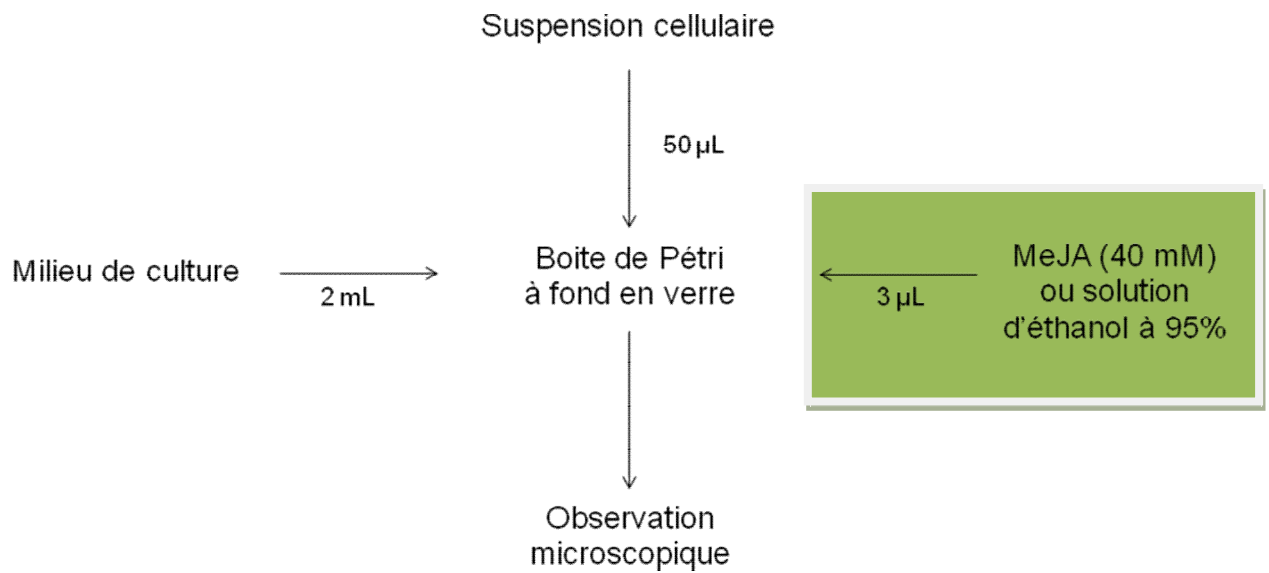


Figure 15 : représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour les observations en vidéomicroscopie et en microscopie confocale. La partie en vert est spécifique à la vidéomicroscopie ; les cellules observées en microscopie confocale sont traitées et incubées en fiole d'Erlenmeyer.

II. Matériels et méthodes

i. Le matériel végétal

Les suspensions cellulaires de *Vitis 41B* sont cultivées en routine en fiole d'Erlenmeyer de 300 mL contenant chacune 100 mL de cellules végétales en suspension dans un milieu de culture liquide Murashige and Skoog (MS) (Murashige et Skoog, 1962) supplémenté avec 0.5 mg/L de benzylaminopurine (BAP) et 0.2 mg/L de 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Annexe 1). Ces suspensions sont cultivées à l'obscurité sur un agitateur magnétique orbital (110 rpm) à une température de 23°C et leur croissance est maintenue par une dilution au demi chaque semaine. En suspension, chaque cellule est isolée ou associée à une ou deux autres par leurs extrémités (restées jointives après la mitose). Les suspensions cellulaires végétales présentent une population de cellules hétérogènes par leur taille et leur phase dans le cycle cellulaire. La division de ces cellules n'est pas synchrone. Pour nos observations, nous avons donc sélectionné le type cellulaire le plus représentatif de la suspension, soit des cellules d'une taille de 100 µm environ jointives à une autre cellule par une de ses extrémités.

ii. Préparation des suspensions cellulaires pour la microscopie

Le montage entre lame et lamelle des cellules en suspension de *Vitis 41B* ne représente pas un moyen d'observation pertinent. En effet, ces cellules ont un volume important et elles se retrouvent aplaties dans ces conditions. Nous avons donc développé un protocole permettant une observation optimale (Figure 15) en plaçant les cellules dans une boîte de Pétri. Elles sédimentent alors à travers le milieu de culture et sont maintenues en place au fond de la boîte par gravité. Pour les observations de fluorescence, une boîte de Pétri à fond verre est nécessaire. Dans le cas où l'élicitation est réalisée directement dans la boîte, l'éliciteur est introduit dans le milieu puis la boîte est légèrement agitée.



iii. Observation en vidéomicroscopie

1. Acquisition des images

La vidéomicroscopie plein champ a été réalisée avec un vidéomicroscope inversé NIKON TE 300 couplé à une caméra CCD (charged coupled device) Micromax (Roper Scientific, Evry, France). Le resvératrol est excité à une longueur d'onde de 330 nm sélectionnée avec un monochromateur Polychrome II (TILL Photonics, Planegg, Germany) conformément au spectre d'excitation du resvératrol (Liang *et al.*, 2008). La fluorescence émise a été détectée en utilisant un objectif x 40 Plan Fluor (Nikon) et un bloc filtre UV-2A (Ex 330-380, DM 400 et BA 420).

Ce microscope est équipé d'un obturateur automatique qui permet d'exposer les cellules à l'excitation uniquement pendant le temps d'exposition nécessaire à l'acquisition de l'image, limitant ainsi l'effet éliciteur potentiel des UV sur les cellules.

Dans le but d'obtenir le suivi de la variation précoce de l'intensité de fluorescence, les images ont été enregistrées durant 1h30 avec un intervalle de 1 min, puis pendant 6 h avec un intervalle de 2 min et enfin toutes les 5 min pendant 20 h. Le temps d'exposition de la caméra choisie (1 s) permet d'obtenir une sensibilité suffisante pour capter une faible intensité de fluorescence tout en limitant la saturation lorsque cette intensité est élevée en fin d'acquisition. Ces expériences ont été réalisées en utilisant le logiciel Metafluor (Molecular device, Downigton, USA).

Des expériences identiques ont été réalisées avec des cellules non-élicitées. Toutes ces manipulations ont été répétées trois fois.

2. Quantification de l'intensité de la fluorescence

La quantification des variations de concentration du resvératrol a été réalisée avec le logiciel Metamorph (Molecular device, Downigton, USA) en mesurant les variations de l'intensité des pixels sur les différentes images acquises au cours du temps. Sur chacune de ces images, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence par unité de surface soit sur la cellule entière soit sur des régions sélectionnées au niveau de la paroi. L'intensité de



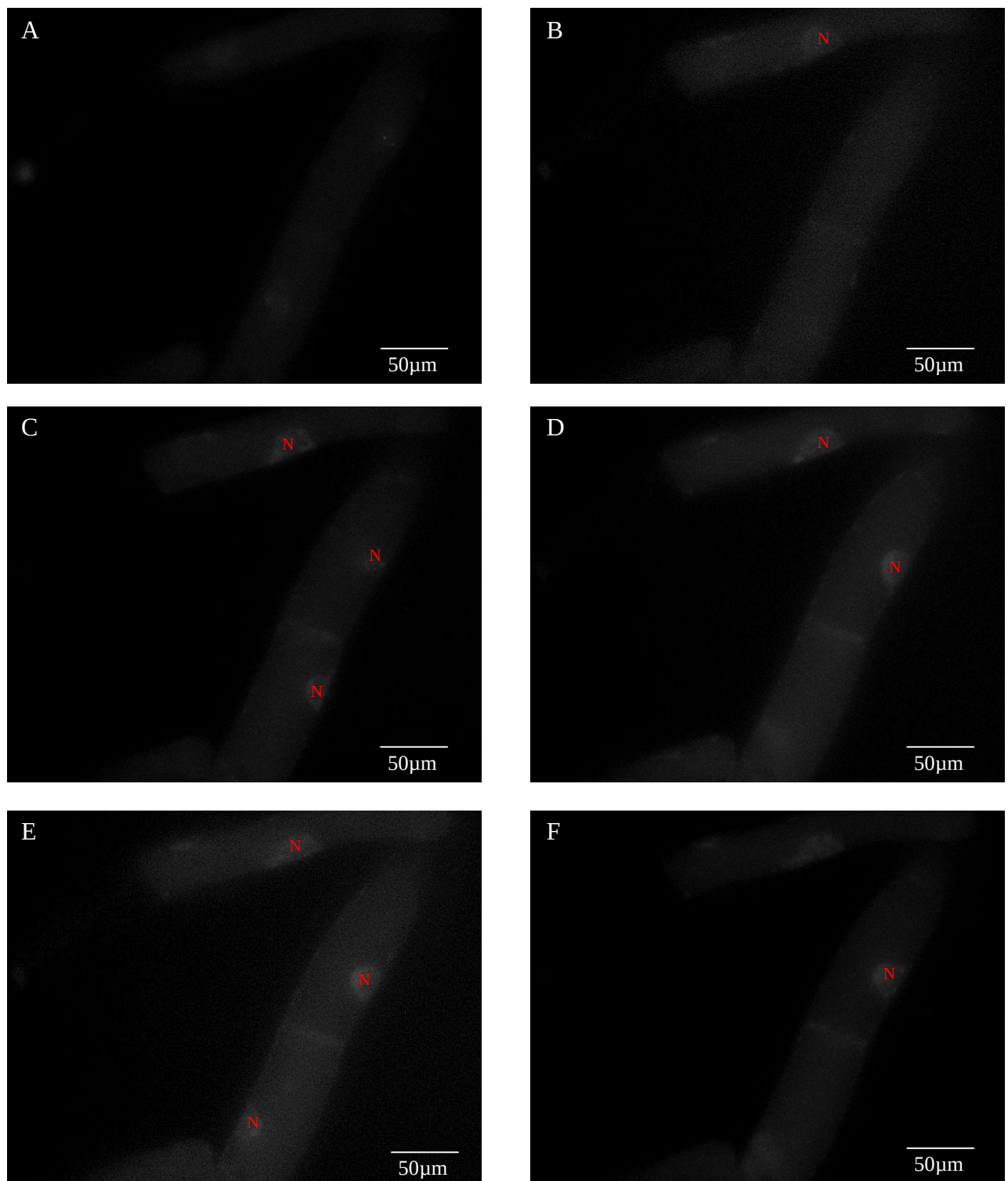


Figure 16 : Photographie de cellules témoins de Vitis 41B observée en vidéomicroscopie obtenues au cours d'un suivi cinétique sur 28 heures. Différents plans ont été sélectionnés à 0 (A), 8 (B), 16 (C), 20 (D), 24 (E) et 28 (D) heures pour représenter l'évolution de l'intensité de fluorescence émise au niveau des cellules au cours du temps. Les noyaux, qui présentent une auto-fluorescence plus intense, ont été marqués par un N de couleur rouge.

fluorescence corrigée correspond à l'intensité de fluorescence mesurée à laquelle nous avons soustrait le bruit de fond résiduel sur chaque image.

iv. Observation en microscopie confocale

Nous avons utilisé un microscope confocal LSM 710 NLO Zeiss (Iena, Germany). Ce microscope est couplé à un laser pulsé Titanium-Sapphire CHAMELEON (Coherent, Santa Clara, USA) utilisé à la longueur d'onde de 715 nm avec une puissance de 5%. Les cellules vivantes sont observées dans une boîte de Pétri à fond verre contenant 2 mL de milieu de culture avec un objectif à immersion x 63 (ON 1,4). L'intensité de fluorescence émise par le resvératrol est collectée avec un filtre passe-bande (370 – 450 nm).

Les piles d'images en Z sont enregistrées avec un pas de 0,5 μm , un zoom numérique x 2 ou x 5 et un filtre de moyennage sur 4 pixels.

Les reconstructions en 3D ont été obtenues à l'aide du logiciel AMIRA (Mercury, Noosa Heads, Australia).



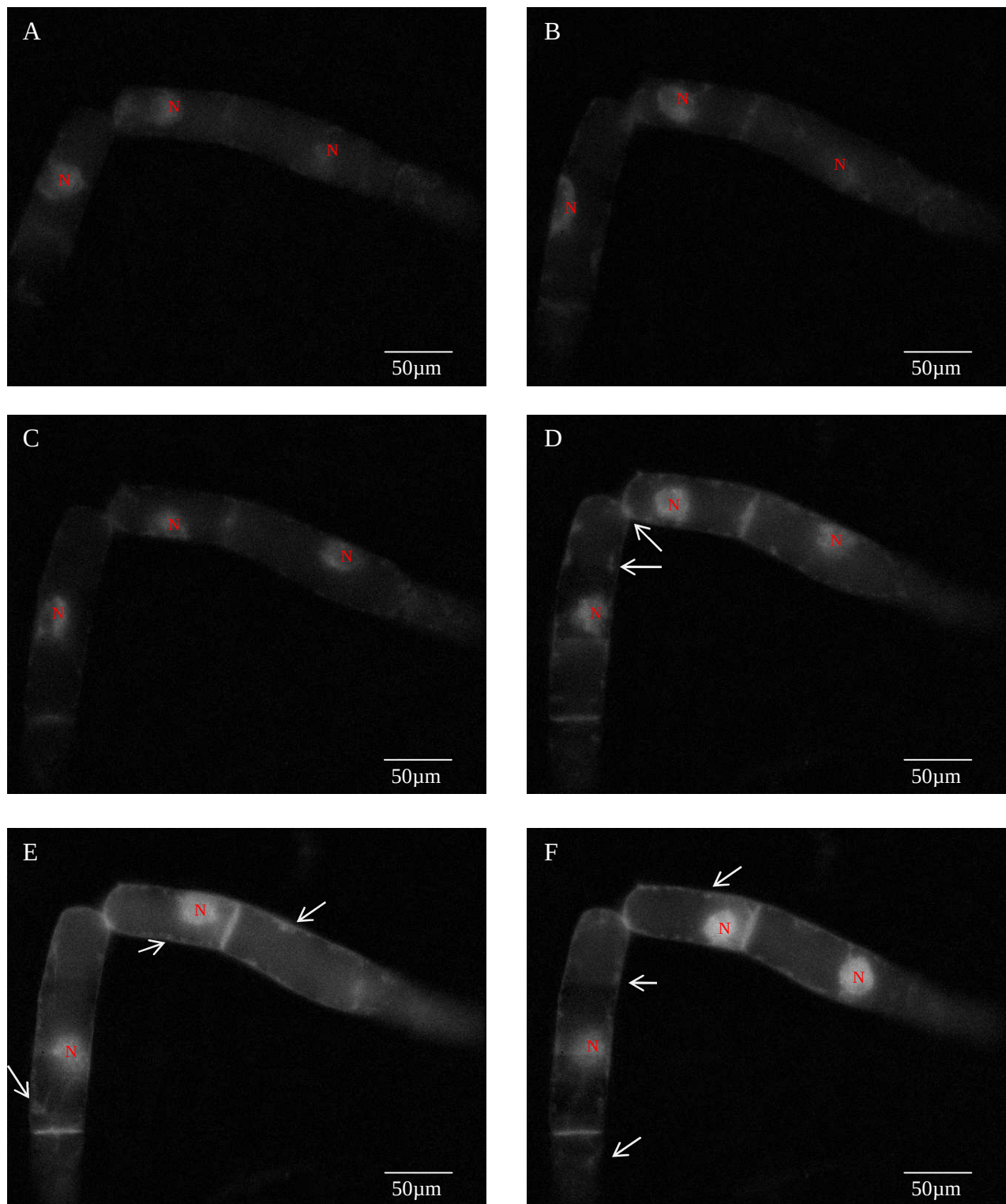


Figure 17 : Photographies de cellules élicitées au MeJA 0,1 mM obtenues au cours d'un suivi cinétique sur 28 heures.

Différents plans ont été sélectionnés à 0 (A), 8 (B), 16 (C), 20 (D), 24 (E) et 28 (D) heures pour représenter l'évolution de l'intensité de fluorescence émise au niveau des cellules au cours du temps. L'apparition de zones d'intensité de fluorescence plus intense a été indiquée par des flèches blanches. Les noyaux, qui présentent une fluorescence intense, ont été représentés par un N de couleur rouge.

III. Résultats et discussions

i. Cinétique d'apparition du resvératrol

1. Observation microscopique

Les cellules végétales, et en particulier celles de vigne, synthétisent de nombreux composés phénoliques. Ces cellules présentent donc une auto-fluorescence lorsqu'elles sont excitées en lumière UV. La longueur d'onde choisie (330 nm) pour l'observation du resvératrol présente un compromis satisfaisant entre une excitation efficace du resvératrol tout en limitant cette auto-fluorescence (résultats non présentés).

Les cellules non élicitées présentent au cours de la cinétique de 28 heures une faible augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure 16). Celle-ci se traduit par une fluorescence diffuse sur la cellule. Les cellules élicitées présentent en revanche une augmentation de l'intensité de fluorescence importante avec un renforcement en fin de cinétique (Figure 17). Cette apparition se traduit dans les premières heures après élicitation par une apparition de zone présentant une intensité de fluorescence plus marquée au niveau du cytoplasme proche de la membrane plasmique (Figure 17). En fin de cinétique l'intensité de fluorescence augmente de manière significative et présente une localisation plus diffuse (Figure 17).

2. Quantification de l'intensité de fluorescence

Ces variations de l'intensité de la fluorescence au niveau des cellules élicitées et non élicitées sont présentées dans la Figure 17. Nous avons observé un accroissement de l'intensité de fluorescence de 30 % pour les cellules non élicitées et de 230 % pour les cellules élicitées. Pour les cellules témoins, cette augmentation est faible et régulière. Les cellules élicitées présentent, quant à elles, une augmentation continue de l'intensité de fluorescence qui débute à 8 heures (500 min) après élicitation, s'accroît à partir de 17 heures (1000 min), puis ralentit après 23 heures (1400 min) (Figure 18).

Compte tenu des paramètres utilisés, l'intensité de fluorescence peut être corrélée à l'intensité de fluorescence intrinsèque des stilbènes. D'un point de vue biosynthétique, le premier stilbène obtenu est le resvératrol. Nous pouvons alors faire le parallèle entre



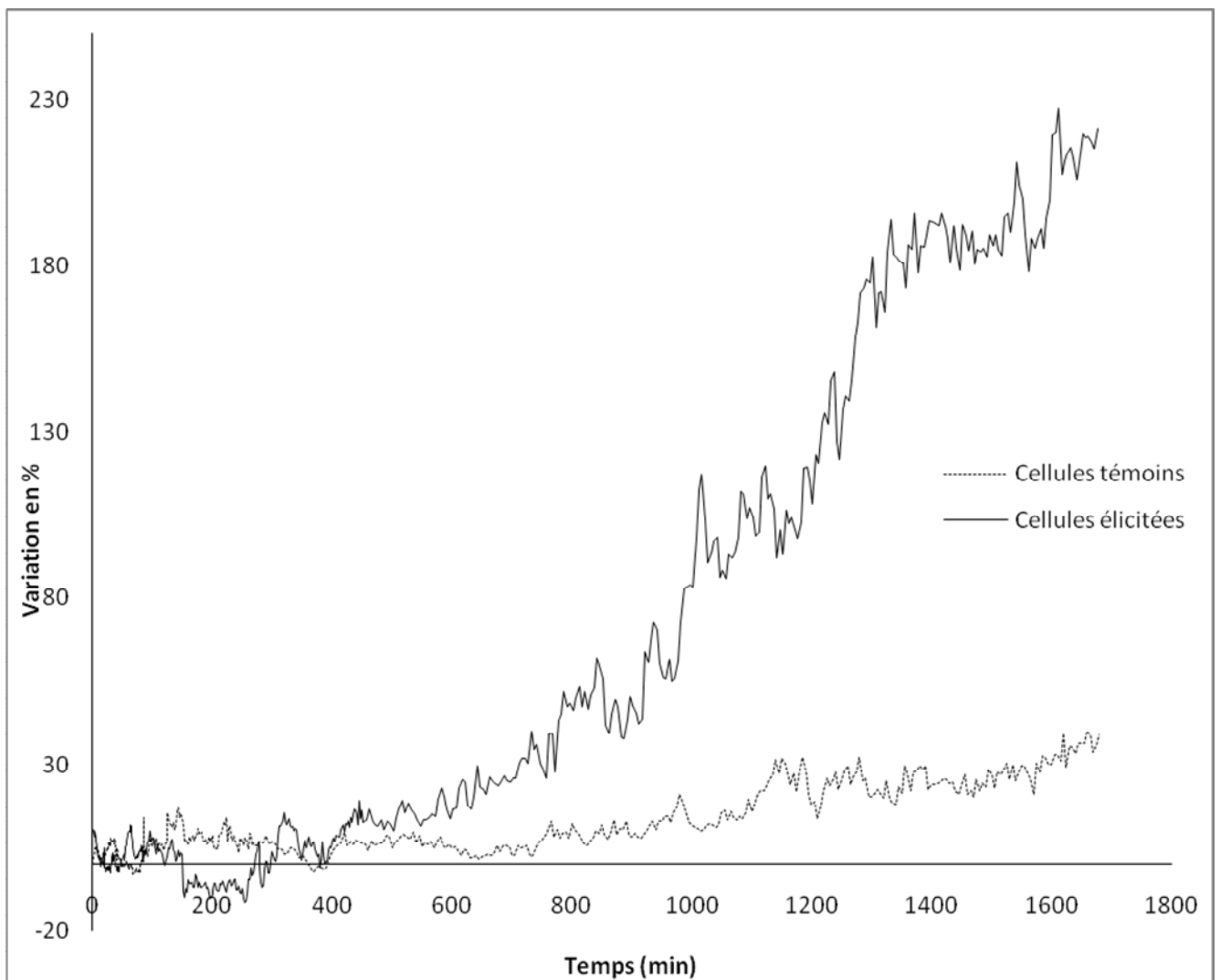


Figure 18 : Variation de l'intensité de fluorescence au cours du temps émise au niveau des cellules de Vitis 41B avec ou sans élicitation avec une concentration de 0,1 mM de MeJA.

l'intensité de fluorescence mesurée et la fluorescence intrinsèque du resvératrol. Il est alors possible d'envisager d'expliquer de manière mécanistique les profils obtenus.

Au niveau des cellules non élicitées, l'augmentation faible de l'intensité de fluorescence observée peut être expliquée par une induction de la synthèse du resvératrol par l'excitation UV nécessaire à l'acquisition des images. En effet les UV sont décrits comme ayant un rôle éliciteur de la synthèse du resvératrol sur cals et sur feuille (Langcake et Pryce, 1977 ; Ku *et al.*, 2005). Les temps d'exposition très courts limitent néanmoins cette induction mais n'autorisent pas de s'en affranchir complètement.

Au niveau des cellules élicitées par le MeJA, l'induction de la synthèse de resvératrol semble débiter de manière précoce (8 heures). Le resvératrol semble donc être synthétisé et accumulé de manière plus rapide après l'élicitation comparativement aux résultats décrits précédemment dans la littérature (Jeandet *et al.*, 2010). Le profil de suivi de la synthèse précoce de resvératrol obtenu vient appuyer l'hypothèse émise sur la présence de STS constitutive. En effet, une accumulation précoce de resvératrol, obtenue seulement 8 heures après l'introduction de l'éliciteur, ne peut être expliquée par une synthèse *de novo* de STS. Les ARNm de la STS sont chez la vigne obtenus en deux vagues dont la première apparaît entre 6 et 12 heures (Jeandet *et al.*, 2010). Ce temps est donc trop court pour obtenir des enzymes actives. La synthèse précoce de resvératrol pourrait donc bien être réalisée par des STS présentes de manière constitutive. Entre 15 et 20 heures, une intensification de l'accumulation du resvératrol est visible, cette phase pourrait alors être due à l'activation des STS synthétisées *de novo*. Après 20 heures, un ralentissement de cette accumulation se dessine avant une reprise à environ 25 heures. Ce ralentissement pourrait être expliqué par un équilibre entre la synthèse et l'excrétion du resvératrol. En effet, 24 heures après élicitation, du resvératrol peut être détecté dans le milieu de culture en CCM et en HPLC.

La technique de vidéomicroscopie a permis l'obtention d'information sur la cinétique précoce de la synthèse de resvératrol. Toutefois elle a pu mettre en évidence l'apparition à l'intérieur des cellules élicitées de structures présentant une intensité de fluorescence importante. Ces structures apparaissent de manière précoce et leur nombre augmente au cours de la cinétique (Figure 19). Afin de déterminer la réalité de ces structures et leurs origines, nous avons choisi d'avoir recours à la microscopie confocale afin de compléter nos observations et de définir plus précisément la localisation de l'accumulation du resvératrol.



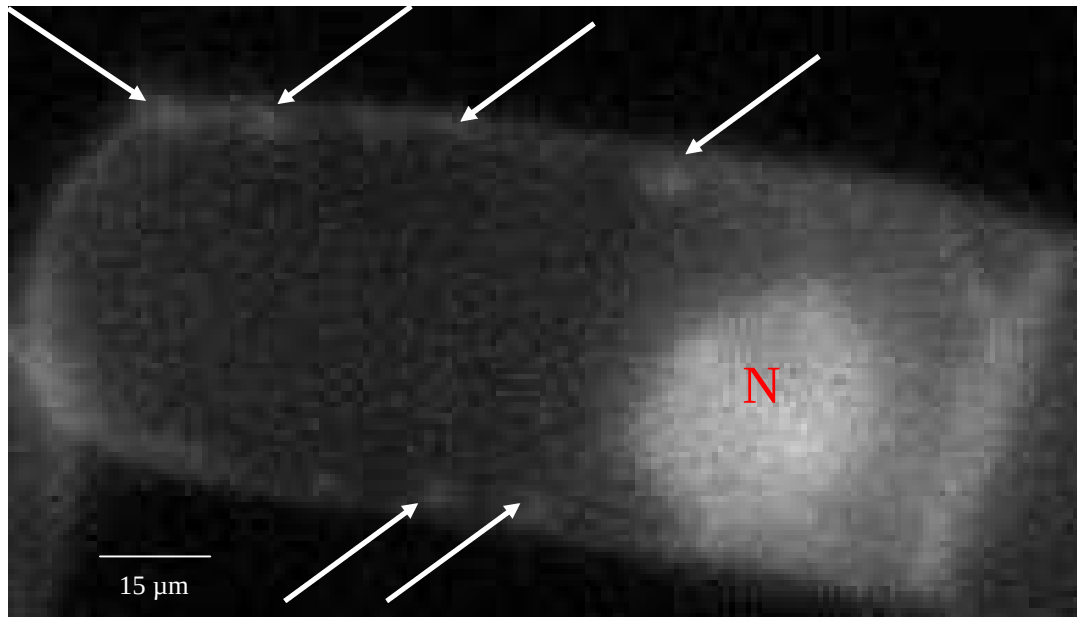


Figure 19 : Détail d'une photographie de cellules Vitis 41B 28 heures après élicitation au MeJA 0,1 mM. L'apparition de zones d'intensité de fluorescence plus intense a été indiquée par des flèches blanches. Les noyaux, qui présentent une fluorescence intense, ont été représentés par un N de couleur rouge.

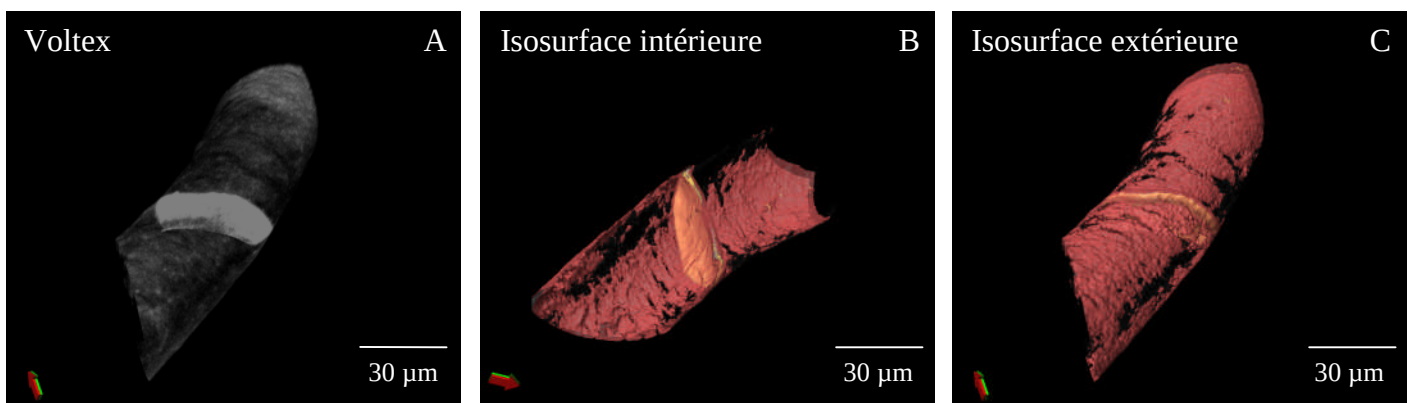


Figure 20 : Reconstructions 3D des cellules végétales de Vitis 41B (taille réelle des cellules : 100 μm) réalisées en microscopie optique confocale ($\lambda = 710 \text{ nm}$) (confocale) et traitées avec le logiciel de reconstruction 3D Amira. Ces cellules ont été incubées dans une solution de resvératrol (0,1 mg/mL) pendant 30 minutes. La colonne de gauche présente la reconstruction de l'intensité de fluorescence en rendu volumique (Voltex) émise par les cellules après différents temps d'incubation avec du MeJA. Les deux autres colonnes présentent ces mêmes cellules avec un rendu surfacique (isosurface). Les rendus surfaciques sont représentés respectivement par le rouge pour les faibles niveaux d'intensité de fluorescence et le jaune pour les plus intenses.

ii. Localisation de l'apparition du resvératrol et transport

Les images obtenues en microscopie confocale ont été enregistrées sur des cellules de taille et de morphologie semblables. Les cellules étudiées ont une taille d'environ 100 μm de longueur avec un diamètre de 40 μm et elles sont jointives par l'une de leurs extrémités. Ces cellules représentent la majorité de la population cellulaire.

1. Observation de cellules incubées avec du resvératrol

Le resvératrol a la propriété, lorsqu'il est apporté de manière exogène à des cellules, d'adhérer à leur paroi (Adrian, 2006b). Nous avons utilisé comme échantillon de référence des cellules incubées avec du resvératrol afin de déterminer les conditions optimales d'observation en microscopie confocale. Les cellules incubées avec cette solution de resvératrol présentent, après reconstruction en 3 dimensions (3D), une intensité de fluorescence diffuse sur toute la surface cellulaire (Figure 20).

2. Observation des cellules élicitées

Les cellules ont été élicitées au MeJA en fiole d'Erlenmeyer et incubées jusqu'au prélèvement pour l'observation au microscope. Elles ont ensuite été observées après 2, 3, 4 et 7 jours d'incubation. Ces différents temps de prélèvement sont en accord avec la variation de la quantité de resvératrol mesurée dans le milieu de culture (Publication 2).

Les cellules, 48 heures après élicitation, montrent par la représentation Voltex des zones de fluorescence plutôt localisées à la périphérie de la cellule (Figure 21 A). La reconstruction 3D avec un traitement surfacique, basée sur la fluorescence du resvératrol confirme cette observation et indique une faible intensité de fluorescence, représentée en rouge sur la Figure 21 B et C (la couleur est fonction de l'intensité de fluorescence). Celle-ci est matérialisée sur la partie la plus externe de la cellule par des zones discontinues plus ou moins étendues. Après 72 heures, le Voltex traduit une fluorescence plus intense au niveau des zones localisées mais aussi la présence d'une fluorescence diffuse en périphérie (Figure 21 D). Cette augmentation est bien mise en évidence par la reconstruction qui montre que la partie externe de la cellule présente une intensité de fluorescence recouvrant toute sa surface. Cette fluorescence représentée sous la forme de deux feuillets externes par le traitement en isosurface correspond



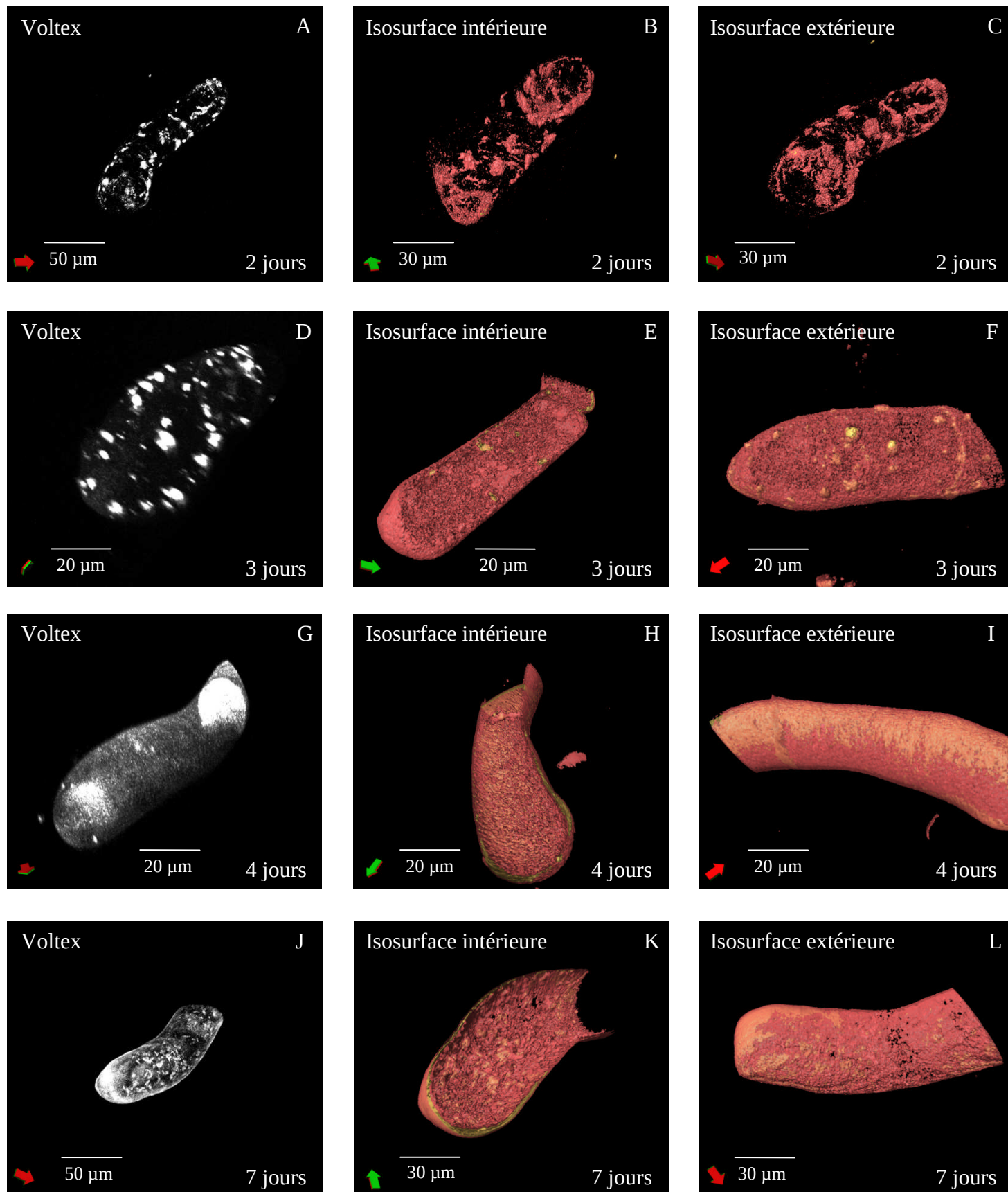


Figure 21 : Reconstructions 3D des cellules végétales de Vitis 41B (taille réelle des cellules : 100 μm) réalisées en microscopie optique multiphoton ($\lambda = 710 \text{ nm}$) (confocale) et traitées avec le logiciel de reconstruction 3D Amira. La colonne de gauche présente la reconstruction de l'intensité de fluorescence en rendu volumique (Voltex) émise par les cellules après différents temps d'incubation avec du MeJA. Les deux autres colonnes présentent ces mêmes cellules avec un rendu surfacique (isosurface). Les rendus surfaciques sont représentés respectivement par le rouge pour les faibles niveaux d'intensité de fluorescence et le jaune pour les plus intenses.

à un volume périphérique de la cellule. A un niveau plus interne, de petites structures de forme arrondie, colorées en jaune (intensité de fluorescence forte), sont visibles (Figure 21 E et F). Elles traversent le volume représenté par les deux feuillets rouges et sont aussi observées par l'isosurface extérieure (Figure 21 F), traduisant la présence de resvératrol du côté externe de la cellule (Figure 21 F). A 96 heures, le Voltex présente une fluorescence moins intense, diffuse et sans présence de zones intenses localisées (Figure 21 G). Quelques structures arrondies sont visibles en position plus interne mais le volume périphérique est plus marqué, montrant une coloration jaune au niveau des deux feuillets et au niveau de la jonction de deux cellules. L'observation de l'isosurface extérieure présente une structure lissée, traduisant une fluorescence homogène et générale sur l'ensemble du contour cellulaire (Figure 21 H). L'observation des cellules à 168 heures (Figure 21 J, K et L) montre une représentation Voltex assez confuse mais les isosurfaces indiquent une persistance de la fluorescence sur l'ensemble de la cellule mais de manière moins homogène qu'à 96 heures.

3. Discussion

a. Le volume périphérique

Le volume, représenté par les deux feuillets colorés en rouge (Figure 21), pourrait correspondre à la paroi cellulaire. Cependant, sans marquage spécifique, il est difficile de localiser avec précision cette intensité de fluorescence. Toutefois, en microscopie en lumière transmise, nous observons que la paroi des cellules en suspension est très fine. Les isosurfaces entourant le volume périphérique sembleraient représenter la partie la plus externe de la paroi et la surface externe de la membrane plasmique. Il est possible de comparer ces observations avec celles réalisées lors de l'incubation de cellules non-élicitées avec du resvératrol où il a été mis en évidence que ce composé pouvait venir s'adsorber à la paroi. Le franchissement de la membrane plasmique par le resvératrol pourrait être obtenu par différents mécanismes, la diffusion simple ou par transports actifs par exemple (Suzuki *et al.*, 2010). Lorsque les cellules sont élicitées, l'accumulation maximale de resvératrol est obtenue dans le milieu de culture (Donnez *et al.*, 2009, 2010). Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces observations : soit le resvératrol est synthétisé dans la paroi où la STS est présente (Fornara *et al.*, 2008), soit le resvératrol est synthétisé dans la cellule et est ensuite excrété,



mais il est aussi possible que ces deux phénomènes coexistent. Dans les deux cas, la cellule limiterait la quantité de resvératrol présente à l'intérieur du cytoplasme. Cette observation est aussi confirmée par la transformation en picéide du resvératrol et son stockage dans la vacuole réalisé chez certains cultivars (Donnez *et al.*, 2009).

b. Les zones à forte intensité de fluorescence

Ces zones arrondies de tailles variées présentent une forte intensité de fluorescence spécifique du resvératrol (Figure 21). Elles pourraient alors représenter les vésicules cytoplasmiques décrites dans la bibliographie et qui contiennent la STS (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). Ces vésicules seraient alors mises en évidence en microscopie par le resvératrol qu'elles contiennent. La localisation de ces vésicules au niveau du cytoplasme est aussi un point de convergence avec la localisation plus interne des structures jaunes par rapport au volume périphérique à 48 heures. En revanche, ces zones se retrouvent au milieu de ce volume à 72 heures, ce qui peut conduire à l'hypothèse que ces vésicules subissent un phénomène d'exocytose, pouvant ainsi expliquer la présence des STS dans la paroi. Les spots de fluorescence traversent le volume périphérique et dans l'hypothèse où ce volume représente la paroi végétale, ce comportement peut correspondre aux mécanismes classiques de transports actifs. Dans le cas de vésicules d'exocytose, celles-ci fusionnent avec la membrane plasmique en libérant leur contenu à l'extérieur de la cellule au niveau de la paroi (Battey *et al.*, 1999). Cette libération crée un important flux d'excrétion qui permet la traversée de la paroi par diffusion simple. Ce phénomène serait matérialisé ici par la formation de zones de faible diamètre mais de l'épaisseur de la paroi présentant une intensité de fluorescence plus intense marquée en jaune. Ces zones représenteraient alors la diffusion du resvératrol émise lors de l'exocytose ou lors de la traversée de canaux transmembranaires.



IV. Conclusion

Les observations réalisées ont permis de mieux appréhender la cinétique précoce d'apparition du resvératrol dans les cellules en suspensions de *Vitis* 41B après élicitation. Les informations recueillies indiquent une synthèse en deux temps. Une première phase de synthèse mise en place très rapidement après l'élicitation probablement due à l'activation de STS constitutives (Wang *et al.*, 2010). Ensuite, une seconde phase où les STS produites *de novo* entrent en action et induisent une intensification de la synthèse de resvératrol.

Concernant la localisation et le transport du resvératrol, il est difficile dans l'état actuel, de conclure quant aux mécanismes et aux structures cellulaires impliqués précisément. Toutefois, les résultats obtenus en microscopie permettent de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques concernant la biosynthèse du resvératrol :

- tout d'abord notre système d'étude est pertinent pour accéder aux événements précoces de la localisation de la biosynthèse du resvératrol ; l'absence de stilbènes dans les cellules non-élicitées permet des comparaisons liées directement à une synthèse *de novo* du resvératrol.

- la complémentarité des méthodes microscopiques utilisées a permis de montrer que la synthèse du resvératrol était cytosolique, voire pariétale mais en aucun cas vacuolaire.

- l'excrétion du resvératrol produit après élicitation est massive, comme l'ont montré les quantifications par HPLC ; le suivi dynamique du resvératrol en vidéomicroscopie et en microscopie confocale confirme qu'il existerait des zones cellulaires localisées pour sa biosynthèse et son excrétion. Ceci est en accord avec la mise en évidence par immunolocalisation de vésicules cytosoliques contenant les STS (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). L'observation des structures jaunes de fluorescence traversant le volume périphérique semble indiquer une excrétion également localisée et importante, confirmée par l'augmentation de la quantité de resvératrol dans les suspensions élicitées qui est maximale à 96 heures. Il est donc possible d'envisager que la biosynthèse du resvératrol a lieu dans des vésicules cytosoliques et que le composé soit ensuite excrété par des transporteurs situés dans la membrane plasmique (Suzuki *et al.*, 2010), avant de diffuser à travers la paroi de la cellule. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires pour compléter ce travail, notamment par des marquages spécifiques des structures cellulaires (paroi par exemple) pour une meilleure localisation des structures impliquées et la recherche des transporteurs du resvératrol participant à son excrétion massive.



Discussion générale



Au cours de ce travail, il s'agissait premièrement de mettre en place un modèle d'étude performant dans le cadre de l'étude des stilbènes de la vigne. Pour répondre à cet objectif, l'emploi d'une suspension cellulaire issu d'un porte-greffe, le *Vitis* 41B, est apparu comme pertinent dans le sens où les porte-greffes ont pour rôle d'accroître les capacités de défense des vignes européennes, notamment contre le phylloxéra. Les autres systèmes cellulaires décrits dans la bibliographie correspondent généralement à des cultivars de l'espèce *Vitis vinifera* (Donnez *et al.*, 2009). Le système cellulaire de *Vitis* 41B a montré au cours des différentes manipulations des caractéristiques permettant d'envisager l'étude fondamentale de la synthèse du resvératrol à l'échelle cellulaire mais aussi une application en bioproduction. Les différents aspects développés au cours de ce travail ont permis une connaissance approfondie de ce système cellulaire mais ont aussi apporté des éléments concrets sur la cinétique et la localisation du resvératrol, ouvrant des perspectives appliquées et fondamentales.

I. Propriétés du système de suspension cellulaire Vitis 41B

Au niveau de la croissance, ce système de culture présente des performances intéressantes par rapport aux autres systèmes décrits dans la bibliographie (Donnez *et al.*, 2009). Le temps de doublement des cellules de *Vitis* 41B a été évalué à 4 jours. Il présente une phase de latence brève de 2 jours et la cinétique complète est achevée en 14 jours. Durant ce temps de culture, la biomasse est multiplié d'un facteur 7 (Donnez *et al.*, 2010).

Nous avons montré que les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B sont capables de s'adapter à différentes conditions et volumes de culture. En effet, leur culture en bioréacteur de 2 et 10 litres a pu être réalisée. L'obtention de quantité de biomasse cellulaire importante en bioréacteur peut également conduire à l'étude des enzymes permettant la biosynthèse, le transport et la métabolisation des stilbènes. De plus l'accumulation de stilbènes et en particulier de resvératrol laisse envisager la possibilité d'une application pour la bioproduction de ces molécules.

L'absence de stilbènes en condition de culture de routine et la forte induction de leur synthèse après élicitation, fait de ce système un atout pour l'étude des mécanismes cellulaires liés à l'induction de la synthèse de ces molécules. L'application à l'étude de la cinétique précoce de la synthèse de resvératrol, à la localisation de celle-ci et au transport de ce



composé illustre bien les potentialités de ce système. Les quantités de resvératrol accumulées restent faibles par rapport à d'autres systèmes cellulaires capables de produire plusieurs grammes par litre de culture de resvératrol (Donnez *et al.*, 2009). Toutefois, ce système permet de produire des formes oligomériques, qui ont été décrites pour la première fois en culture cellulaire en bioréacteur. La production de ces formes dérivées apporte une originalité à ce système et elle permet d'approcher le comportement des cellules de vigne au vignoble, où la synthèse de ces oligomères est décrite comme un caractère de résistance vis-à-vis de certains pathogènes (Schnee *et al.*, 2008).

II. Application du système à l'étude de la synthèse de resvératrol

L'étude de nombreux mécanismes cellulaires peut être envisagée par l'emploi des cultures cellulaires végétales. La microscopie, couplée à l'utilisation de cellules en suspension, représente un binôme complémentaire et dynamique dans l'étude des mécanismes cellulaires. La microscopie permet des observations non destructives qui autorisent des suivis cinétiques. De plus, le resvératrol est une molécule possédant une fluorescence intrinsèque compatible avec les observations en microscopie à fluorescence, sans ajout de fluorochrome.

La vidéomicroscopie a permis de suivre en temps réel l'apparition de la fluorescence du resvératrol, ainsi que sa quantification. Ces résultats démontrent que la synthèse de resvératrol est induite rapidement et son accumulation est détectée dans la cellule 8 heures seulement après l'éllicitation. La courbe de quantification de l'intensité de fluorescence permet de plus d'identifier 3 phases distinctes qui pourraient correspondre (i) au début de la synthèse par la STS présente de manière constitutive, puis dans un deuxième temps, (ii) à une accélération de l'accumulation pouvant être expliquée par l'activation de STS produite *de novo* et (iii) à une phase de ralentissement de l'accumulation qui peut être corrélée à une intensification de l'excrétion.

Le travail réalisé ensuite avec l'utilisation de la microscopie multiphotons ouvre une discussion sur les mécanismes qui régissent l'excrétion du resvératrol. Même si ces résultats nécessitent d'être approfondis, les images obtenues permettent d'émettre des hypothèses sur ces mécanismes. L'observation de zones de fluorescence intenses et localisées spécifiques au resvératrol a été confirmée lors de nombreuses répétitions et au cours de différents temps de



cinétique. Leur localisation cytosolique et pariétale serait à rapprocher de la mise en évidence de la STS réalisée par ailleurs par immunolocalisation (Fornara *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010). L'observation localisée de cette fluorescence traversant la paroi cellulaire à certains moments de la cinétique confirmerait l'existence de transporteurs du resvératrol, en accord avec la mise en évidence de ce composé majoritairement retrouvé dans le milieu extracellulaire. L'optimisation de l'étude du système cellulaire en microscopie confocale permettrait une avancée importante dans la connaissance du mécanisme d'excrétion des stilbènes au niveau cellulaire chez la vigne, mais aussi chez d'autres espèces. Le système d'étude pourrait même représenter un modèle pour comprendre les mécanismes d'excrétion des métabolites secondaires naturellement fluorescents d'une façon plus générale.

III. Conclusions

Ce travail de thèse a abouti à la caractérisation et à la mise en place d'un système cellulaire performant applicable à l'étude de nombreux mécanismes cellulaires liés à la synthèse des stilbènes et en particulier du resvératrol. Des techniques innovantes pour l'étude du végétal, vidéomicroscopie et microscopie confocale ont été utilisées pour l'étude des mécanismes de la synthèse du resvératrol. Ces techniques ont donné des résultats inédits ne pouvant pas en l'état apporter de démonstration concrète du mécanisme d'excrétion des stilbènes. Toutefois, elles permettent d'émettre des hypothèses et restreindre le champ de recherche qui peut être envisagé avec d'autres techniques. La protéomique pour l'étude des enzymes impliqués dans l'excrétion et la métabolisation des stilbènes ou la biologie moléculaire pour suivre l'expression des gènes codant pour des transporteurs, en sont des exemples.

Ces suspensions cellulaires de *Vitis* 41B pourraient aussi être utilisées à la bioproduction de stilbènes autres que le resvératrol. Même si actuellement, la production de resvératrol reste faible comparée à d'autres systèmes utilisant des résines extracellulaires, de nombreuses optimisations pourraient être apportées aux conditions de culture. L'introduction de chitosan, notamment qui augmente la production de biomasse d'un facteur de 1,5, illustre parfaitement le type d'amélioration qui pourrait être réalisé. Ce travail de thèse aboutit donc à une application permettant d'obtenir une meilleure connaissance fondamentale des mécanismes lié à la synthèse des stilbènes mais également à un système qui pourrait être appliqué à la bioproduction de ces composés.



IV. Perspectives

Ce travail de thèse ouvre de nombreuses perspectives tant sur le plan des mécanismes fondamentaux relatifs à la synthèse des stilbènes, que sur leur bioproduction. Ces deux thématiques sont liées en de nombreux points, comme notamment au niveau des mécanismes qui régissent l'oligomérisation du resvératrol en ses dérivés complexes. L'approfondissement des connaissances des mécanismes permettant la dimérisation du resvératrol est dans un premier temps un point crucial à examiner. D'un point de vue de la défense de la vigne, les oligostilbènes et en particulier les ϵ - et δ -viniférines joueraient un rôle plus important dans la protection de la vigne en champ contre l'oïdium (Schnee *et al.*, 2008). Le système cellulaire de *Vitis* 41B pourrait alors permettre d'étudier de manière simplifiée les mécanismes de la biosynthèse des viniférines, avant de retranscrire ces données sur plante entière. En parallèle, une meilleure connaissance du mécanisme d'oligomérisation pourrait permettre de l'intensifier ou de l'inhiber en fonction de la molécule souhaitée en bioproduction. En effet, une relation entre la disparition du resvératrol et l'apparition des formes oligomériques a pu être établie. De plus, les meilleurs rendements en termes de production de resvératrol sont obtenus avec des suspensions ne produisant que du resvératrol et où l'éliciteur (des cyclodextrines) est capable de protéger celui-ci contre son oligomérisation en l'incorporant à sa structure et en le stabilisant (Bru et Pedreno, 2006). Afin de mimer les effets de protection du resvératrol, différentes techniques pourraient être envisagées pour l'extraire ou le stabiliser au fur et à mesure de sa production. Des essais préliminaires encourageants avaient été obtenus par prélèvement et lavage du milieu en continu ou par ajout dans le milieu de culture de résine Amberlite XAD. La validation de ces techniques permettrait d'accroître les niveaux de production en resvératrol. L'élévation au MeJA conduit à une inhibition de la croissance (Donnez *et al.*, 2010 ; publication 3). Plusieurs hypothèses ont pu être formulées suite à ce constat, le MeJA induit-il cette inhibition ou est-ce une rétro-inhibition causée par la présence du resvératrol ? La stabilisation ou l'extraction du resvératrol permettraient de mieux comprendre ce mécanisme. La caractérisation de la mort cellulaire en PCD (program cell death) ou en nécrose pourrait apporter une explication de ce phénomène d'inhibition de la croissance cellulaire.

Concernant la synthèse précoce de resvératrol, celle-ci pourrait être complétée en continuant l'utilisation de la microscopie multiphotons. Il serait alors possible d'obtenir en temps réel une image de la cellule avec une sensibilité de détection supérieure à celle de la



vidéomicroscopie. Ces manipulations pourraient être associées à l'analyse en protéomique (Wang *et al.*, 2010) de la quantité de STS présente en condition élicitée et non-élicitée afin d'évaluer l'impact de la synthèse *de novo* de cette enzyme et ainsi vérifier l'hypothèse émise concernant la cinétique de synthèse du resvératrol (Tassoni *et al.*, 2005). Une étude en protéomique du milieu de culture pourrait permettre de comparer les profils des protéines présentes avec et sans élicitation (Martines-Esteso *et al.*, 2009). Cette analyse serait menée dans le but d'identifier des enzymes capables d'oligomériser ou de dégrader le resvératrol. Parallèlement une coloration spécifique des différents constituants cellulaires, comme la paroi, la membrane plasmique, la vacuole ou le cytoplasme, en microscopie confocale permettrait une localisation des différentes zones de fluorescence décrites dans la partie 2. La détermination de cette localisation est un point important nécessaire à la compréhension du mécanisme d'excrétion du resvératrol. Les mécanismes de transport des métabolites secondaires et en particulier du resvératrol sont peu décrits dans la bibliographie, même si certains ABC transporteurs ont été identifiés comme pouvant être impliqués dans le transport du resvératrol (Suzuki *et al.*, 2010). L'amélioration des connaissances sur ce sujet représente donc un enjeu important afin de mieux comprendre l'impact du resvératrol et des stilbènes en général dans la défense des plantes. Le resvératrol est, chez les animaux ou les microorganismes, capable de pénétrer dans les cellules de manière passive (par diffusion simple à travers la membrane plasmique) ou active (par des ABC transporteurs) (Delmas *et al.*, 2006). Une recherche en biologie moléculaire, après élicitation, de l'induction des gènes de plantes homologues de ceux codant pour la synthèse de ces transporteurs chez les animaux ou les microorganismes, pourrait alors être envisagée.



Références



- Abe, M., Shibaoka, H., Yamane, H., & Takahashi, N. (1990). Cell cycle-dependent disruption of microtubules by methyl jasmonate in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 156(1-2), 1-8.
- Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., & Joubert, J. M. (1996). Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1979-1981.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A., & Bessis, R. (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against botrytis cinerea, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), 1689-1702.
- Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Tesson, L., & Bessis, R. (2000). Stilbene content of mature vitis vinifera berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6103-6105.
- Adrian, M., & Jeandet, P. (2006). *Trans*-resveratrol as an antifungal agent. In: Resveratrol in health and disease (Aggarwal, B.B. and Shishodia, S., eds), *CRC Press* 475-497.
- Adrian, M. (2006b). Mécanisme de defense de la vigne : élitation, production et rôle des phytoalexines, applications. HDR.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5 A), 2783-2840.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects vitis vinifera L. against botrytis cinerea. *Plant Cell Reports*, 22(8), 608-614.
- Andre, P., & Renimel, I., LVMH Recherche (2007). Protecting and regenerating composition. US 2007/0243148 A1.
- Anekonda, T. S. (2006). Resveratrol-A boon for treating alzheimer's disease? *Brain Research Reviews*, 52(2), 316-326.
- Arichi, H., Kimura, Y., & Okuda, H. (1982). Effects of stilbene components of the roots of polygonum cuspidatum sieb. et zucc. on lipid metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(5), 1766-1770.
- Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., & Mérillon, J.-M. (2004). Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in vitis vinifera cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109(3), 301-308.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M., & Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against botrytis cinerea and plasmopara viticola. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), 1118-1128.
- Barger, J. L., Kayo, T., Vann, J. M., Arias, E. B., Wang, J., Hacker, T. A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J. D., Leeuwenburgh, C., Allison, D. B., Saupe, K. W., Cartee, G. D., Weindruch, R., & Prolla, T. (2008). A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One*, 3(6), article number: e2264.
- Batley, N. H., James, N. C., Greenland, A. J., & Brownlee, C. (1999). Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell*, 11(4), 643-659.
- Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B., & Helfand, S. L. (2004). An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 12980-12985.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., & Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342.



- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2008). What is xenohormesis? *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(1), 149-156.
- Becker, J. V. W., Armstrong, G. O., Van Der Merwe, M. J., Lambrechts, M. G., Vivier, M. A., & Pretorius, I. S. (2003). Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Research*, 4(1), 79-85.
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., De Rie Vos, C. H., & Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5670-5672.
- Beerling, D. J., Bailey, J. P., & Conolly, A. P. (1994). Biological flora of the british isles - *fallopia japonica* (houtt.) ronse decraene (*reynoutria japonica* houtt.; *polygonum cuspidatum* sieb. & zucc.). *Journal of Ecology*, 82(4), 959-979.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493-499.
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7), 233-240.
- Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J. M., Métraux, J.-P., & Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *arabidopsis* leads to a strong resistance to *botrytis cinerea*. *EMBO Journal*, 26(8), 2158-2168.
- Bianchi, N., Zuccato, C., Lampronti, I., Borgatti, M., & Gambari, R. (2009). Fetal hemoglobin inducers from the natural world: A novel approach for identification of drugs for the treatment of β -thalassemia and sickle-cell anemia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), 141-151.
- Blaich, R., & Bachmann, O. (1980). Die Trans-resveratrol Synthese bei Vitaceen: Induktion und zytologische Beobachtungen. *Vitis* 19, 230-240.
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324(5928), 742-743.
- Bonomelli, A., Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E., & Mauro, M.-C. (2004). Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 51-59.
- Bordone, L., & Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 298-305.
- Bradamante, S., Barenghi, L., & Villa, A. (2004). Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22(3), 169-188.
- Breuil, A., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R., & Jeandet, P. (1998). Metabolism of stilbene phytoalexins by *botrytis cinerea*: 1. characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters*, 39(7), 537-540.
- Bru, M. R., & Pedreno, G.M.L.D.E. (2006). Method for the production of resveratrol in cell cultures. *US 2006/0205049 A1*.
- Buer, C. S., Imin, N., & Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98-111.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3337-3340.
- Charlet, S., Gillet, F., Villarreal, M.-L., Barbotin, J.-N., Fliniaux, M.-A., & Nava-Saucedo, J.-E. (2000). Immobilisation of *solanum chrysotrichum* plant cells within ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 875-880.
- Chemler, J. A., & Koffas, M. A. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 597-605.



- Chen, J., Hall, D. E., Murata, J., & De Luca, V. (2006). L-alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Science*, 171(6), 734-744.
- Chevassus-au-Louis, N. (2000). La paradoxale saga du taxol. *La Recherche* 333.
- Chong, J., Poutaraud, A., & Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), 143-155.
- Chu, X., Sun, A., & Liu, R. (2005). Preparative isolation and purification of five compounds from the chinese medicinal herb *polygonum cuspidatum* sieb. et zucc by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1097(1-2), 33-39.
- Collin, P. (2001). L'adaptation au milieu chez les plantes vasculaires. *L'Année Biologique* 40, 21-42.
- Conrath, U., Domard, A., & Kauss, H. (1989). Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8(3), 152-155.
- Couillerot, E., Caron, C., Audran, J., Jardillier, J., & Chénieux, J. (1996). Furoquinoline alkaloid accumulation in *fagara zanthoxyloides* cell cultures is highly dependent on the presence of exogenous benzylaminopurine. *Plant Growth Regulation*, 19(3), 203-206.
- Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98(4), 649-657.
- Courteaux, B. (2007). Recherche d'éléciteurs pour l'induction de Resvératrol dans les suspensions cellulaires de porte greffe 41B et callogénèse sur *Vitis*. Rapport de stage effectué dans le cadre de la Licence Professionnelle Biotechnologies Appliquées à la Santé, URCA.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., & Boulay, M. (2001). In vitro tolerance to botrytis cinerea of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 901-910.
- Davis, T. M. E., Karunajeewa, H. A., & Ilett, K. F. (2005). Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Medical Journal of Australia*, 182(4), 181-185.
- De Luca, V., & St Pierre, B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 5(4), 168-173.
- Decendit, A., Liu, D., Ouelhazi, L., Doireau, P., Mérillon, J.-M., & Rideau, M. (1992). Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *catharanthus roseus* cell cultures - the factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Reports*, 11(8), 400-403.
- Delaunois, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clément, C., & Jeandet, P. (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), 2-12.
- Delmas, D., Lançon, A., Colin, D., Jannin, B., & Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7(4), 423-442.
- Docherty, J. J., Sweet, T. J., Bailey, E., Faith, S. A., & Booth, T. (2006). Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication in vitro. *Antiviral Research*, 72(3), 171-177.
- Donnez, D. (2006). Etude de l'induction de la biosynthèse des stilbènes dans les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B par l'acide salicylique et le méthyljasmonate. Rapport de stage effectué dans le cadre du Master Recherche Production Végétale et Environnement, URCA.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 27(12), 706-713.
- Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2010). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, submitted.



- Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674-684.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.
- Eibl, R., & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 593-598.
- Eibl, R., Werner, S., & Eibl, D. (2009). Disposable bioreactors for plant liquid cultures at litre-scale. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 156-164.
- Eibl, R., Kaiser, S., Lombriser, R., & Eibl, D. (2010). Disposable bioreactors: The current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 41-49.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., & Belanger, R. (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology*, 84(3), 313-320.
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(SUPPL. 1), 69-75.
- Faith, S. A., Sweet, T. J., Bailey, E., Booth, T., & Docherty, J. J. (2006). Resveratrol suppresses nuclear factor- κ B in herpes simplex virus infected cells. *Antiviral Research*, 72(3), 242-251.
- Ferri, M., Tassoni, A., Franceschetti, M., Righetti, L., Naldrett, M. J., & Bagni, N. (2009). Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 9(3), 610-624.
- Ferri, M., Dipalo, S. C. F., Bagni, N., & Tassoni, A. (2011). Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. *Food Chemistry*, 124(4), 1473-1479.
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melanconia* hi. *Phytopathology*. 32, 653-669.
- Forkmann, G., & Martens, S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 155-160.
- Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G., & Citterio, S. (2008). Localization of stilbene synthase in *vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma*, 233(1-2), 83-93.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 341(8852), 1103-1104.
- Futuyma, D. J., & Agrawal, A. A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18054-18061.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., & Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 711-724.
- Georgiev, M. I., Weber, J., & MacIuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 809-823.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Goswami, S. K., & Das, D. K. (2009). Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters*, 284(1), 1-6.
- Grayer, R. J., & Kokubun, T. (2001). Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56(3), 253-263.



- Gronbaek, M., Becker, U., Johansen, D., Gottschau, A., Schnohr, P., Hein, H. O., Jensen, G., & Sørensen, T. I. A. (2000). Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Annals of Internal Medicine*, 133(6), 411-419.
- Gu, M., Su, Z.-G., & Janson, J.-C. (2006). One-step purification of resveratrol and polydatin from *Polygonum cuspidatum* (sieb. & zucc.) by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on cross-linked 12% agarose. *Chromatographia*, 64(11-12), 701-704.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006). Hairy root research: Recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 341-346.
- Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2389-2393.
- Halls, C., & Yu, O. (2008). Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 77-81.
- Harborne, J. B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 335-367.
- Hartmann, T. (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 80(1), 177-188.
- Heil, M., & Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science*, 13(6), 264-272.
- Ho, C. W., & Kuo, H. S. (2008). In vitro resveratrol rich callus tissues derived from *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. and method for producing the same. US 2008/0160560 A1.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41-66.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.
- Huang, L. L., Xue, Z., & Zhu, Q. Q. (2006). Method for the production of resveratrol in a recombinant oleaginous microorganism. WO 2006125000 A2.
- Huang, L. L., Xue, Z., & Zhu, Q. Q. (2007). Method for the production of resveratrol in a recombinant bacterial host cell. US 2007/0031951 A1.
- Huang, T.-K., & McDonald, K. A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 168-184.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gasparo, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F., Weissenbach, J., Quétier, F., & Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463-467.
- Jeandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 41-46.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., & Meunier, P. (1995a). Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*, 143, 135-139.



- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, P., Peyron, D., & Trollat, P. (1995b). Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 316-319.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995c). Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 1-4.
- Jeandet, P. (1997). HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Analytical Chemistry*, 69(24), 5172-5177.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2731-2741.
- Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Paradiso, F., Cocina, R. A., Bolettieri, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., & Courrot, E. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactor*, 36, 331-341.
- Jin, F., Wu, Q., Lu, Y., Gong, Q., & Shi, J. (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced parkinson's disease in rats. *European Journal of Pharmacology*, 600(1-3), 78-82.
- Jones, P., & Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, 213(2), 164-174.
- Jones, D. A., & Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 48-62.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Jong, S. K., Sook, Y. L., & Sang, U. P. (2008). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, arachis hypogaea L. transformed with different agrobacterium rhizogenes strains. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3785-3787.
- Jongedijk, E., Tigelaar, H., van Roekel, J. S. C., Bres-Vloemans, S. A., Dekker, I., van den Elzen, P. J. M., Cornelissen, B. J. C., & Melchers, L. S. (1995). Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 85(1-3), 173-180.
- Kaga, S., Zhan, L., Matsumoto, M., & Maulik, N. (2005). Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(5), 813-822.
- Katsuyama, Y., Funa, N., Miyahisa, I., & Horinouchi, S. (2007). Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in Escherichia coli. *Chemistry and Biology*, 14(6), 613-621.
- Katz, M., Förster, J., David, H., Schmidt, H. P., Sendelius, M., Bjørn, S. P., & Durhuus, T. T., Fluxome Sciences A/S (2008). Metabolically engineered cells for the production of resveratrol or an oligomeric or glycosidically-bound derivative thereof, US 2008/0286844 A1
- Kauffmann, S., Dorey, S., & Baillieul, F. (2009). Vers une stratégie alternative de protection des cultures. *Biofutur*, (296), 26-30.
- Kauss, H., Jeblick, W., & Domard, A. (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of catharanthus roseus. *Planta*, 178(3), 385-392.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. M. (1997). Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.
- Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S.A., & Zhuravlev, Y. N. (2007). The rolB gene-induced overproduction of trans-resveratrol in Vitis amurensis transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128, 681-692.



- Klarzynski, O., & Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences*, 324, 953-963.
- Kliebenstein, D.J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: A view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environment*, 27, 675-684.
- Kopp, P. (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'french paradox'? *European Journal of Endocrinology*, 138(6), 619-620.
- Korhammer, S., Reniero, F., & Mattivi, F. (1995). An oligostilbene from vitis roots. *Phytochemistry*, 38(6), 1501-1504.
- Kouakou, T. H., Téguo, P. W., Valls, J., Kouadio, Y. J., Decendit, A., & Mérillon, J.-M. (2006). First evidence of trans-resveratrol production in cell suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 405-409.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (1999). Stilbene production by vitis vinifera cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Products*, 62(12), 1688-1690.
- Ku, K. L., Chang, P., Cheng, Y. A., & Lien, C.-I. (2005). Production of stilbenoids from the callus of arachis hypogaea: A novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3877-3881.
- Kundu, J. K., & Surh, Y. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2), 243-261.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews*, 5, 305-315.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77-86.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1977). A new class of phytoalexins from grapevine. *Experientia*, 33, 151-152.
- Lanzkron, S., Strouse, J. J., Wilson, R., Beach, M. C., Haywood, C., Park, H., Witkop, C., Bass, E. B., & Segal, J. B. (2008). Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Annals of Internal Medicine*, 148(12), 939-955.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., & Bertsch, C. (2009). Esca and black dead arm: Two major actors of grapevine trunk diseases. [Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne]. *Comptes Rendus - Biologies*, 332(9), 765-783.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Chèze, C., Deffieux, G., & Mérillon, J.-M. (1998). Regulation of polyphenol production in vitis vinifera cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports*, 17(12), 946-950.
- Lebret, T., & Méjean, A. (2008). Metastases from urethelial carcinoma: Role of chemotherapy. [Les métastases des cancers urothéliaux : place de la chimiothérapie]. *Progres En Urologie*, 18(SUPPL. 7), S261-S276.
- Leifert, W. R., & Abeywardena, M.Y. (2008). Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* 28, 729-737.
- Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck université (Bruxelle, Belgique).
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., & Subirade, M. (2008). Interaction of β -lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*, 9(1), 50-56.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R., & Pedrão, M. A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in monastrell grapevine cell cultures. *BMC Research Notes*, 1, 132.



- Lin, L.-L., Lien, C.-Y., Cheng, Y.-C., & Ku, K.-L. (2007). An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 853(1-2), 175-182.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J. M., & Núñez-Delicado, E. (2007). Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry*, 104(1), 39-44.
- Maes, D. H., Mohammadi, F., Qu, L., Czarnota, A., Mammone, T., Declercq, L., & Zecchino, J. R., The Estee Lauder cos., Inc. (2009). Emulsion cosmetic compositions containing resveratrol derivatives and silicone surfactant. US 2009/0035237 A1.
- Marchal, R., Tabary, I., Valade, M., Moncomble, D., Viaux, L., Robillard, B., & Jeandet, P. (2001). Effects of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine foaming properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1371-1378.
- Martinez-Esteso, M. J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J. C., Pedreño, M. A., & Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*vitis vinifera* cv. gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73(2), 331-341.
- Massey, F. P., Roland Ennos, A., & Hartley, S. E. (2007). Herbivore specific induction of silica-based plant defences. *Oecologia*, 152(4), 677-683.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S. F., Bennett, S., Dolan, M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.
- Miranda-Ham, M. D. L., Islas-Flores, I., & Vázquez-Flota, F. (2007). Accumulation of monoterpenoid indole alkaloids in periwinkle seedlings (*catharanthus roseus*) as a model for the study of plant-environment interactions. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(3), 206-210.
- Mirro, R., & Voll, K. (2009). Which impeller is right for your cell line? *BioProcess International*, 7(1), 52-57.
- Morales, M., Bru, R., García-Carmona, F., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (1998). Effect of dimethyl- β -cyclodextrins on resveratrol metabolism in gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *xylophilus ampelinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(3), 179-187.
- Morimoto, S., Suemori, K., Moriwaki, J., Taura, F., Tanaka, H., Aso, M., Tanaka, M., Suemune, H., & Shimohigashi, Y. (2001). Morphine metabolism in the opium poppy and its possible physiological function. biochemical characterization of the morphine metabolite, bismorphine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38179-38184.
- Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2, 29-48.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Santamaria, A. R., la Marca, G., & Pasqua, G. (2010). High-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of stilbenoids in cell cultures of *vitis vinifera* L., cv. malvasia. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(14), 2065-2073.
- Müller, K. O., & Börger, H. (1940) Experimentelle Untersuchungen u"ber die Phytophthora Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst*, 23, 189-231.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H., & De Luca, V. (2008). The leaf epidermome of *catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell*, 20(3), 524-542.



- Mysore, K. S., & Ryu, C. (2004). Nonhost resistance: How much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97-104.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Review* 1, 69-79.
- Nonomura, S., Kanagawa, H., & Makimoto, A. (1963) Chemical constituents of *Polygonaceous* plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* SIEB et ZUCC). *Yakugaku Zasshi* 83, 988-990.
- Oksman-Caldentey, K.-M., & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
- Osborn, A. (1996). Saponins and plant defence - A soap story. *Trends in Plant Science*, 1(1), 4-9.
- Ough, C. S., & Berg, H. W. (1979). Powdery mildew sensory effect on wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 321.
- Pace-Asciak, C. R., Hahn, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., & Goldberg, D. M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235(2), 207-219.
- Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F., Ciriolo, M. R., & Garaci, E., (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *Journal of Infectious Diseases*, 191(10), 1719-1729.
- Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., Sharma, K., Pleshko, N., Woollett, L.A., Csiszar, A., Ikeno, Y., Le Couteur, D., Elliott, P. J., Becker, K. G., Navas, P., Ingram, D. K., Wolf, N. S., Ungvari, Z., Sinclair, D. A., & de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metabolism*, 8(2), 157-168.
- Petit, A.-N., Baillieu, F., Vaillant-Gaveau, N., Jacquens, L., Conreux, A., Jeandet, P., Clément, C., & Fontaine, F., (2009). Low responsiveness of grapevine flowers and berries at fruit set to UV-C irradiation. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1155-1162.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., & Viret, O. (2003). δ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5488-5492.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van Der Ent, S., & van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308-316.
- Pillarsetti, S. (2008). A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 3(3), 156-164.
- Pilloy, J. (2006). La lutte contre le paludisme : le marché de l'artémisinine et des dérivés. *Medecine Tropicale*, 66, 554-557.
- Pryce, R. J., & Langcake, P. (1977). α -Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry*, 16, 1452-1454.
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 51-64.
- Rausher, M. D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, 411(6839), 857-864.



- Rayne, S., Karacabey, E., & Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 335-340.
- Renaud, S., & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523-1526.
- Repka, V. (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 44, 555-565.
- Repka, V., Fischerová, I., & Silhárová, K. (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 48(2), 273-283.
- Roberts, S. C., & Shuler, M. L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2), 154-159.
- Rocha-González, H. I., Ambriz-Tututi, M., & Granados-Soto, V. (2008). Resveratrol: A natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 14(3), 234-247.
- Rodrigue, C. M., Arous, N., Bachir, D., Smith-Ravin, J., Romeo, P.-H., Galacteros, F., & Garel, M.-C. (2001). Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. *British Journal of Haematology*, 113(2), 500-507.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast*, 8(6), 423-488.
- Routien, J. R., & Nickel, L. G. (1956). Cultivation of plant tissue. US Patent No. 2,747,334, 1956.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8(10), 1809-1819.
- Schnee, S., Viret, O., & Gindro, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), 128-133.
- Schöppner, A., & Kindl, H. (1984). Purification and Properties of a Stilbene Synthase from Induced Cell Suspension Cultures of Peanut. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 6806-6811.
- Schürch, C., Blum, P., & Züllli, F. (2008). Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 599-605.
- Sharma, S., Chopra, K., & Kulkarni, S. K. (2007). Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: Participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytotherapy Research*, 21(3), 278-283.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5(1), 9-23.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 199-208.
- Slaughter, A. R., Hamiduzzaman, M. M., Gindro, K., Neuhaus, J.-M., & Mauch-Mani, B. (2008). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: Involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), 185-195.
- Sobolev, V. S., Guo, B. Z., Holbrook, C. C., & Lynch, R. E. (2007). Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2195-2200.
- Stenglein, S. A., Arambarri, A. M., Sevillano, M. C. M., & Balatti, P. A. (2005). Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens varies among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae, Phaseoleae) Flora-Morphology, Distribution. *Functional Ecology of Plants*, 200, 285-295.



- Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101(2), 449-457.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., & De Luca, V. (1999). Multicellular compartmentation of catharanthus roseus alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, 11(5), 887-900.
- Stummer, B. E., Francis, I. L., Markides, A. J., & Scott, E. S. (2003). The effect of powdery mildew infection of grape berries on juice and wine composition and on sensory properties of chardonnay wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 28-39.
- Suzuki, M., Jasinski, M., Martinoia, E., Nishikawa, Y., Wada, K., Yamada, K., Yamaki, S., Matsumoto, S., & Shiratake, K. (2010). ABC transporter VvPDR1/VvABCG1 from grape berry skin. Poster présenté au 15ème Workshop, Adelaide 2010 (Australia), Plant Membrane Biology.
- Swift, H. F. (1920). Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *Journal of Experimental Medicine*, 69-75.
- Tabata, M. (1988). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (Vasil, I.K., Eds). In: Plant Cell Cultures. Vol. 5. Phytochemicals Academic Press (San Diego), 99.
- Takaoka, M.J. (1940). Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.), J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial University 3, 1-16.
- Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A. J., Perry, B., & Bagni, N. (2005). Jasmonates and na-orthovanadate promote resveratrol production in vitis vinifera cv. barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166(3), 895-905.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 351-357.
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. In: Plant Cell Culture Protocols. 2nd edn. (Loyola-Vargas, B. M., Vazquez-Flota, F., Totowa, NJ., Eds.). Humana Press Inc. 9, 32.
- Tian, T., Sun, Q., Shen, J., Zhang, T., Gao, P., & Sun, Q. (2008). Microbial transformation of polydatin and emodin-8-β-d-glucoside of polygonum cuspidatum sieb. et zucc into resveratrol and emodin respectively by rhizopus microsporus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 861-866.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of botrytis cinerea. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 405-413.
- Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Biology*, 16(3), 296-300.
- van Etten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., & Farmer, E. E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell*, 6, 1191-1192.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.
- Vannelli, T., Xue, Z., Breinig, S., Qi, W. W., & Sariaslani, F. S. (2007). Functional expression in escherichia coli of the tyrosine-inducible tyrosine ammonia-lyase enzyme from yeast trichosporon cutaneum for production of p-hydroxycinnamic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4), 413-422.
- Vasil, I. K. (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 387-394.
- Vercauteren, J., Castagnino, C., & Delaunay, J.-C., Caudalie. (2003). Compositions based on Resveratrol. US 6,572,882 B1
- Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3, 232-238.



- Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.-P., Deffieux, G., & Merillon, J.-M. (2002). Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in vitis vinifera cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 49-56.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., & Park, S. (2008). Systemic acquired resistance: The elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 436-442.
- Vyas, R., & Cino J. (2007). A technique for increasing yields in bioreactors and disposable cell-culture systems. *Application Notes*, doi:10.1038/an2255.
- Waffo-Teguo, P., Lee, D., Cuendet, M., Mérillon, J.-M., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, D. A. (2001). Two new stilbene dimer glucosides from grape (vitis vinifera) cell cultures. *Journal of Natural Products*, 64(1), 136-138.
- Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*, 96(3), 675-679.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis Jr., J. E., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377-1382.
- Wang, H.-L., Lee, P.-D., Liu, L.-F., & Su, J.-C. (1999). Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40(3), 219-225.
- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T., & Pasinetti, G. M. (2006). Moderate consumption of cabernet sauvignon attenuates A β neuropathology in a mouse model of alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 20(13), 2313-2320.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., & Huang, W.-D. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (vitis vinifera L. cv. cabernet sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 142-152.
- Waterhouse, A. L., & Lamuela-Raventos, R. M. (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry*, 37(2), 571-573.
- Watts, K. T., Lee, P. C., & Schmidt-Dannert, C. (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered escherichia coli. *BMC Biotechnology*, 6, 22.
- White, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9, 585-600.
- Wilson, P. D. G. (1997). The pilot-scale cultivation of transformed roots. In: *Hairy roots, culture and applications*, (Doran, P.M. ed). *Harwood academic publishers*, 179-190.
- Wittstock, U., & Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5 (4), 300-307.
- Wood, J. G., Regina, B., Lavu, S., Hewitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., & Sinclair, D. A. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), 686-689.
- Wu, S., & Chappell, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 145-152.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sariaslani, F. S., & Huang, L. (2007). Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(1), 58-64.
- Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*, 580(4), 1183-1191.
- Zamboni, A., Vrhovsek, U., Kassemeyer, H., Mattivi, F., & Velasco, R. (2006). Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (vitis spp.). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 45(2), 63-68.



-
- Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L., & Yu, L. J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 22(19), 1561-1564.
- Zhang, Y., Li, S., Li, J., Pan, X., Cahoon, R. E., Jaworski, J. G., Wang, X., Jez, J. M., Chen, F., & Yu, O. (2006). Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*, 128(40), 13030-13031.
- Zhang, H.-S., Zhou, Y., Wu, M., Zhou, H., & Xu, F. (2009). Resveratrol inhibited tat-induced HIV-1 LTR transactivation via NAD⁺-dependent SIRT1 activity. *Life Sciences*, 85(13-14), 484-489.
- Zhao, R.-Z., Liu, S., & Zhou, L.-L. (2005a). Rapid quantitative HPTLC analysis, on one plate, of emodin, resveratrol, and polydatin in the chinese herb *polygonum cuspidatum*. *Chromatographia*, 61(5-6), 311-314.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005b). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.



Annexes



Annexe 1 : milieu de culture MS modifié pour les suspensions cellulaires de 41B et Gamborg B5 pour celles de *V. labrusca*.



Milieu Gamborg B5 pour *V. labrusca*

Pour 1L de milieu :

Macro éléments 100 mL

Micro éléments 10 mL

Vitamines 10 mL

Fe EDTA 5 mL

NAA 100 µL d'une solution à 1 mg/mL

Kinétine 200 µL d'une solution à 1 mg/mL

Saccharose 30 g

Régulation du pH à 5,8 avant autoclavage

Dans le cas d'un milieu solide ajout de 3 g de gelrite après avoir régulé le pH.

Milieu Gamborg B5 pour *V. labrusca*

MACRO ELEMENTS pour 1L (x10)

KNO ₃	2,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	134 mg
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	170 mg
MgSO ₄ , 7H ₂ O	250 mg
CaCl ₂ , 2H ₂ O	150 mg

MICRO ELEMENTS pour 1L(x100)

MnSO ₄ , H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	3 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,250 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	25 µL solution à 1 mg/mL
CoCl ₂ , 6H ₂ O	25 µL solution à 1 mg/mL
KI	0,750 mg

VITAMINES pour 1L(x100)

Méso-inositol	100 mg
Acide nicotinique	1 mg
Thiamine-HCl	10 mg
Pyridoxine-HCl	1 mg

Fe EDTA pour 1L (x5):

FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,78 g
NaEDTA, 2H ₂ O	3,73 g



Milieu MS pour V. 41B

Pour 1L de milieu :

Macro éléments 100 mL

Micro éléments 10 mL

Vitamines 10 mL

Fe EDTA 5 mL

2,4 D 100 µL d'une solution à 1 mg/mL

BAP 200 µL d'une solution à 1 mg/mL

Saccharose 30 g

Régulation du pH à 5,75 avant autoclavage

Dans le cas d'un milieu solide ajout de 7,5 g d'agar après avoir régulé le pH.

Milieu MS pour V. 41B

MACRO ELEMENTS pour 1L (x1000)

NH ₄ NO ₃	16,5 g
KNO ₃	19 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	3,7 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	4,4 g

MICRO ELEMENTS pour 1L(x100)

MnSO ₄ , H ₂ O	1714 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1059 mg
H ₃ BO ₃	620 mg
KI	83 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,5 mL solution à 1 mg/mL
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2,5 mL solution à 1 mg/mL

VITAMINES pour 1L(x100)

Méso-inositol	15 mg
Acide nicotinique	75 mg
Pyridoxine HCL	75 mg
Thiamine	15 mg
Glycine	300 mg

Fe EDTA pour 1L (x5):

FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,78 g
NaEDTA, 2H ₂ O	3,73 g



Annexe 2 : Article de revue paru dans Biofutur.



Bioproduction

Production du resvératrol par voie biotechnologique : une réalité ?

Depuis la découverte du *French paradox*, les propriétés biologiques du resvératrol ont évolué vers de nouvelles cibles thérapeutiques et renforcé ses utilisations nutraceutique et cosmétique. Devant cette demande accrue, la production du resvératrol par voie biotechnologique ne semble pas impossible... et pourrait permettre de s'inscrire dans une optique de durabilité.

*1 Molécule de défense antifongique

- (1) Langcake P, Pryce RJ (1976) *Physiol Plant Pathol* 9, 77-86
- (2) Kundu JK, Surh YJ (2008) *Cancer Lett* 269, 243-61
- (3) Wood JG et al. (2004) *Nature* 430, 686-9
- (4) Ledford H (2010) *Nature* 465, 480-1
- (5) Schnee et al. (2008) *Physiol Mol Plant P* 72, 128-33
- (6) Fremont L (2000) *Life Sci* 66, 663-73
- (7) Donnez D et al. (2009) *Trends Biotechnol* 27, 706-13
- (8) Petit P (1988) *Biofutur* 73, 45-48

Le resvératrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène), molécule appartenant à la grande famille des composés à noyau aromatique des végétaux, et plus particulièrement au groupe des stilbènes, fait l'objet d'attention toutes particulières dans de nombreux laboratoires. Tout a commencé en 1940 par sa caractérisation chimique chez le Véraire (*Veratrum grandiflorum*), qui lui a donné son nom, puis par la découverte de son rôle de phytoalexine*1 chez la vigne (1). De façon plus générale, le resvératrol est caractérisé chez différentes espèces végétales comme étant une molécule liée aux stress (lésions, rayonnement UV). À son rôle de défense chez les plantes sont venues s'ajouter ses propriétés antioxydantes, mises en évidence dans le *French paradox*, associant faible consommation de vin rouge et régime alimentaire méditerranéen dans la protection du système cardiovasculaire. Depuis quelques années, les publications décrivant l'action du resvératrol sur les cancers (prévention, traitement) sont en constante augmentation (2). Ses effets contre le vieillissement et, plus récemment, contre le diabète via l'activation des sirtuines (3) sont l'objet d'un débat scientifique contradictoire (4).

L'ensemble de ces propriétés a conduit à une mise sur le marché importante de gélules contenant du resvératrol extrait des racines de la Renouée du Japon (*Polygonum cuspidatum* syn. *Fallopia japonica*) pour une utilisation en tant que complément alimentaire. Et c'est au niveau de cette origine végétale que se situe ce que l'on pourrait appeler le *Polygonum paradox* du resvératrol, molécule rendue célèbre par sa présence dans le vin, le raisin et la vigne mais dont l'approvisionnement provient de l'extraction d'une plante médicinale largement cultivée en Chine. Il s'avère en effet plus facile d'extraire le resvératrol des racines de la Renouée que des sarments de vigne. Cependant, une demande de plus en plus pressante sur la traçabilité des produits naturels, l'utilisation de procédés d'extraction en phase avec la durabilité et l'environnement, et les stratégies marketing font de la vigne un acteur de plus en plus incontournable.

La mise sur le marché de compléments alimentaires ou de produits cosmétiques contenant du resvératrol ou certains de ses dérivés oligomériques issus de la vigne est aujourd'hui une réalité. Ont été en effet décrits chez la vigne des dérivés de resvératrol actifs, comme l'e-viniférine, et d'autres oligomères plus complexes non présents chez *P. cuspidatum*. Ces composés présents de façon constitutive, dans les sarments (phytoanticipines), ou induite, au niveau des feuilles et des baies, apparaissent très actifs contre les champignons de la vigne comme l'oidium et le mildiou (5), et possèdent de fortes propriétés antioxydantes (6). Devant les contraintes liées à l'approvisionnement en matériel végétal et à une extraction difficile, l'utilisation des voies biotechnologiques peut être considérée avec intérêt. C'est pourquoi l'aptitude de suspensions cellulaires de vigne à produire du resvératrol en conditions in vitro et des études menées par génie génétique pour bioproduire le resvératrol par culture de micro-organismes sont actuellement en plein développement (7).

Produire du resvératrol par culture cellulaire végétale

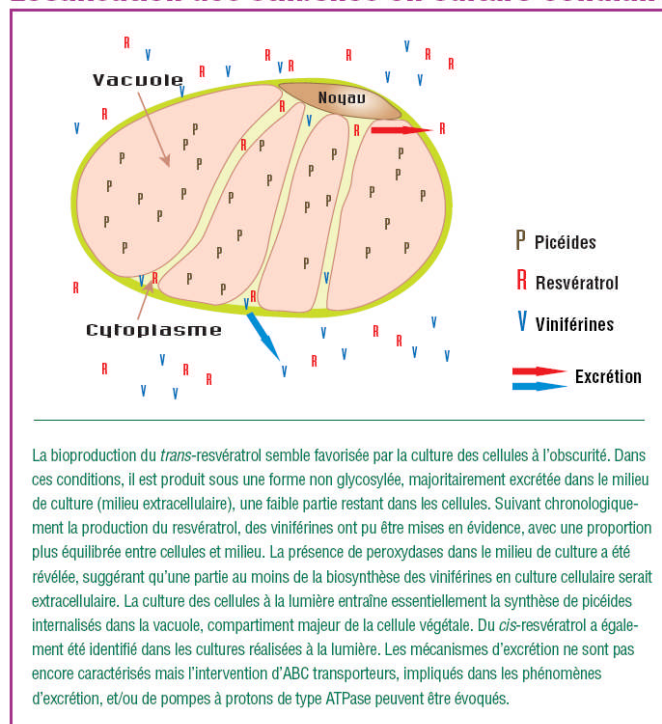
« Cellules végétales en bioréacteur : pendant les travaux, les recherches continuent ». Ce titre faisait l'objet d'un article de Biofutur de novembre 1988 (8). Quelque vingt-deux ans plus tard, il semble toujours d'actualité. L'utilisation de suspensions cellulaires végétales pour la production de molécules d'intérêt (métabolites secondaires) fait toujours l'objet de recherches fondamentales mais s'est aussi diversifiée vers la bioproduction de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. Des avancées majeures ont été obtenues sur la connaissance des voies de biosynthèse de ces composés végétaux et leur régulation, dont l'étude s'est largement appuyée sur la technique de l'élicitation, consistant à déclencher



artificiellement les mécanismes de défense des cellules végétales. L'utilisation d'éliciteurs, biotiques ou abiotiques, a permis de caractériser des voies de réponse diverses et complémentaires (*burst* oxydatif, production de protéines PR²...), dont celles entraînant la biosynthèse de novo de métabolites de défense antifongiques, les phytoalexines. L'élicitation a aussi montré que la quantité de métabolites secondaires constitutifs, comme les alcaloïdes ou les terpènes, augmente lorsque les cellules végétales sont soumises à l'action d'un éliciteur. Cette réaction s'explique par une activation des gènes conduisant à leur production et/ou à l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans leur synthèse (9). Cette technique a donné des résultats probants avec différents métabolites végétaux d'intérêt dont le paclitaxel, anticancéreux notoire (Taxol®). L'essentiel des recherches en culture cellulaire concernant le resvératrol et/ou ses dérivés est conduit chez la vigne. Des travaux ont été menés sur l'arachide, avec l'utilisation de racines transformées, et sur des suspensions cellulaires de coton mais les productions de resvératrol obtenues étaient relativement faibles (inférieures au mg/g de masse sèche cellulaire). Concernant la vigne, chaque équipe travaillant sur le sujet a développé ses propres cultures, il y a donc une diversité parmi les espèces du genre *Vitis* utilisées. Pour la seule production de resvératrol, les résultats les plus performants ont été obtenus avec des *V. vinifera* gamay rouge (3,28 g/L de milieu de culture) et *V. vinifera* Monastrell albino (4,963 g/L), cultures élicitées avec des cyclodextrines³ (10). Les chercheurs ont montré que certaines cyclodextrines jouent non seulement un rôle éliciteur mais aussi protecteur du resvératrol qui est excrété dans le milieu de culture extracellulaire. Ainsi stabilisé, le resvératrol s'accumule facilement. L'utilisation de cellules issues de porte-greffe 41B⁴ a permis d'obtenir une production de novo de resvératrol allant jusqu'à 300 mg/L en bioréacteur de 2 L – un des meilleurs résultats obtenus à ce jour – en élicitant les cellules avec du méthyljasmonate (11), molécule signal produite par les plantes pour déclencher leurs mécanismes de défense. Là encore, la majorité du resvératrol produit (90 %) est retrouvée dans le milieu de culture.

Des dérivés du resvératrol, notamment les formes glycosylées, ont pu être isolés de cultures de *V. vinifera* gamay teinturier cultivées à la lumière avec une teneur en picéïdes (formes glycosylées du resvératrol) de 840 mg/L mais faible en resvératrol (12). Il semble en effet que les conditions de culture des cellules, notamment l'exposition à la lumière ou à l'obscurité, influent d'une part sur la nature des stilbènes produits, d'autre part sur leur excrétion dans le milieu de culture. Le resvératrol est ainsi produit en quantité importante dans les cellules cultivées à l'obscurité et est majoritairement retrouvé à l'extérieur de ces cellules. La lumière privilégie la production de glucosides et induit la synthèse de *cis*-resvératrol. Au vu de ces observations, il apparaît que l'obtention de resvératrol nécessite une suspension cellulaire cultivable à l'obscurité et élicitable pour envisager un passage en bioréacteur pilote, voire industriel. Une autre caractéristique de l'utilisation des

Localisation des stilbènes en culture cellulaire



suspensions cellulaires de vigne réside dans leur aptitude à pouvoir synthétiser des oligomères de resvératrol, potentiellement plus actifs que le resvératrol lui-même (11). Une production de viniférines (δ et ϵ) a été caractérisée dans les cellules élicitées mais également dans le milieu de culture, ce qui peut permettre de diversifier la production en offrant une palette de stilbènes (figure ci-dessus), contrairement à ce que peuvent produire les racines de la Renouée, limitées à la production de picéïde – et de resvératrol après déglycosylation. Il apparaît donc tout à fait réalisable de produire des stilbènes, en particulier du resvératrol, par culture cellulaire de vigne. Les quantités obtenues in vitro sont conséquentes pour un métabolite secondaire végétal et la molécule retrouvée dans le milieu de culture est facilement extractible. Reste à présent à quitter la paillasse du laboratoire pour passer à une production pilote, voire industrielle. L'exemple des cellules d'if (*Taxus chinensis*), utilisées pour la production du Taxol® en bioréacteur de 75 000 L par la société Phyton Biotech, prouve que la technologie industrielle des cellules végétales en bioréacteur de grand volume n'est plus une utopie. Un *scale-up*⁵ pour les suspensions cellulaires de vigne apparaît donc envisageable, sous réserve de pouvoir transposer les résultats obtenus en laboratoire en les adaptant progressivement à des volumes de culture supérieurs.

(9) Vasconsuelo A, Boland R (2007) *Plant Sci* 172, 861-75
(10) Bru MR, Pedreno GMLDE (2006) *US* 2006/0205049 A1
(11) Donnez D et al. (2010), soumis
(12) Vitrac X et al. (2002) *J Biotechnol* 95, 49-56

² Pathogenesis-related

³ Oligomères cycliques naturels du glucose obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon

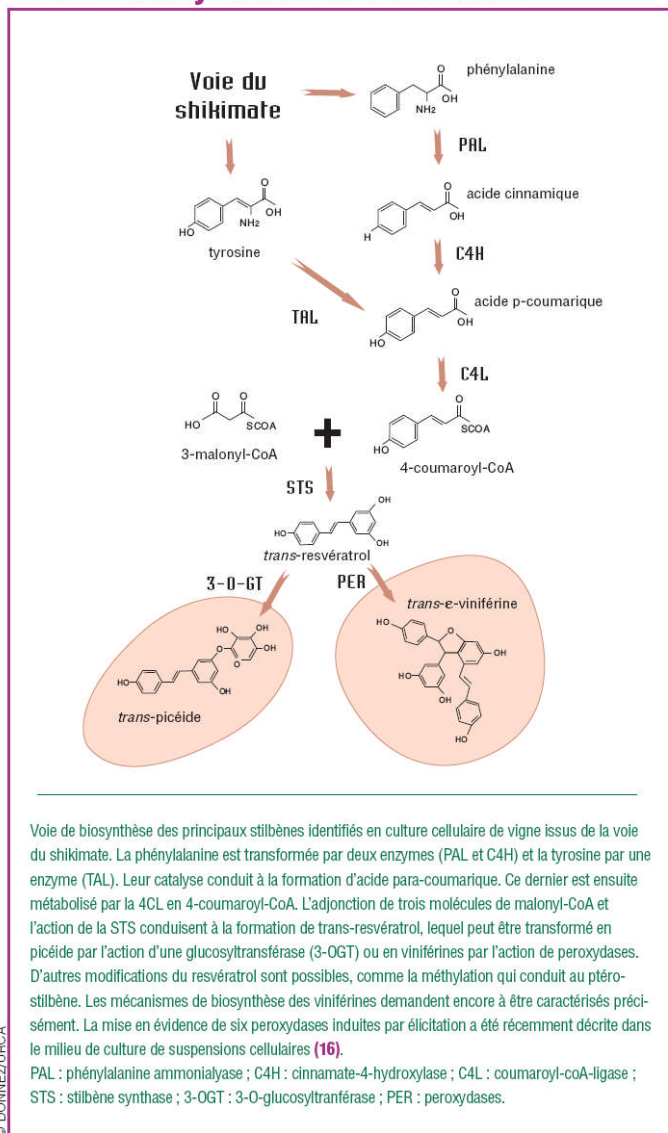
⁴ Depuis l'épidémie de phylloxera à la fin du XIX^e siècle, tous les cépages de *V. vinifera* doivent être greffés sur des porte-greffes d'origine américaine résistants à la maladie, ici *V. berlandieri* x *V. vinifera* cv Chasselas

⁵ Passage de quelques litres de suspension à plusieurs centaines, puis à des quantités industrielles



Bioproduction

Voie de biosynthèse du resvératrol



Produire du resvératrol par biotechnologie microbienne

- (13) Zhang Y et al. (2006) *J Am Chem Soc* 128, 13030-1
(14) Watts KT et al. (2006) *BMC Biotechnol* 6, 22
(15) Sydor T et al. (2010) *Appl Environ Microbiol* 76, 3361-3
(16) Martínez-Esteso MJ et al. (2009) *J Proteomics* 73, 331-41

Les micro-organismes sont devenus des outils de production incontournables de nombreuses molécules. Leur sélection, leur facilité de culture et leur possible modification génétique conduisent à des utilisations massives dans différents secteurs industriels, tant alimentaire que pharmaceutique ou cosmétique. Leur taille réduite entraîne un meilleur taux de division que celui obtenu pour les cellules végétales et leur culture est maîtrisée en grand volume (plusieurs centaines de milliers de litres). Leur résistance aux forces de cisaillement et leurs temps de culture courts en font des outils de production

performants. Aucun micro-organisme n'a cependant été décrit comme produisant du resvératrol, molécule spécifiquement végétale. La relative simplicité de sa voie métabolique (figure ci-contre) a donc rapidement conduit les microbiologistes à un transfert des gènes impliqués dans sa biosynthèse chez les bactéries et les levures.

Deux stratégies ont été retenues, l'une consistant à transférer l'ensemble de la voie métabolique (quatre gènes codant les enzymes PAL ou TAL, C4H, 4CL et STS), l'autre, seulement les gènes codant pour 4CL et STS. Dans le premier cas, le *feeding* (apport de nutriments) est réalisé avec de la phénylalanine ou de la tyrosine, dans le second, par un apport de coumarate. Les transformations de la bactérie *Escherichia coli* ont conduit à des productions allant de 3,6 à 171 mg/L de resvératrol, selon l'origine des enzymes 4CL et STS (13,14). L'utilisation des levures a globalement donné des productions inférieures à 10 mg/L mais des résultats publiés récemment, relatifs à une souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* transformée avec une 4CL d'*Arabidopsis thaliana* et une STS de *V. vinifera*, ont montré une production de 391 mg/L (15). La bonne coordination des gènes et/ou des enzymes nécessaires à la biosynthèse semble être un objectif essentiel à atteindre. D'autre part, les travaux réalisés décrivent des manipulations ciblées sur le resvératrol et ne permettent pas d'envisager la production de ses dérivés comme les viniférines décrites dans des suspensions cellulaires de vigne.

Plantes ou micro-organismes ?

La production biotechnologique de resvératrol est déjà une réalité si l'on se réfère à l'utilisation actuelle par la société Fluxome d'une souche de levure *S. cerevisiae* transformée et utilisée commercialement. Les micro-organismes se trouvent donc à un stade plus avancé de développement. À l'avantage de ces derniers, on citera leur capacité à croître rapidement en fermenteurs de grands volumes, leur relative facilité à être génétiquement transformés et l'expérience acquise depuis des années sur ce type de biotechnologie. En revanche, la nécessité de la transgénèse peut poser problème dans le sens où une obtention de resvératrol par technologie recombinante risque d'être rejetée par les consommateurs européens. En effet, le resvératrol est une molécule végétale et la demande en produits naturels d'origine non-OGM est à considérer pour des utilisations cosmétiques et nutraceutiques. Ainsi, la voie de production potentiellement la plus performante, celle des micro-organismes, pourrait ne pas être applicable pour toutes les utilisations du resvératrol, permettant alors aux cultures végétales de prendre également leur place en bioproduction. Les cellules de vigne élicitées en particulier montrent des aptitudes de biosynthèse importante, qui atteignent près de 5 g/L de milieu de culture, production bien supérieure à celle des micro-organismes mais nécessitant des temps de culture beaucoup plus longs. Elles offrent, en outre, la possibilité de produire des dérivés du resvératrol comme les viniférines, molécules actives de plus en plus recherchées, non retrouvées chez la Renouée du Japon, ni chez les micro-organismes connus. ●



Annexe 3 : Article de revue paru dans Biofactor.



Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants

Philippe Jeandet,^{1*} Bertrand Delaunois,¹ Alexandra Conreux,¹ David Donnez,¹ Vitale Nuzzo,² Sylvain Cordelier,¹ Christophe Clément,¹ and Eric Courot¹

¹Research Unit "Vines and Wines of Champagne—Stress and Environment," UPRES EA 2069, Faculty of Sciences, University of Reims, Reims Cedex 02, France

²Dipartimento di Scienze dei Sistemi Culturali, Forestali e dell'Ambiente, Università degli Studi della Basilicata, V. le Dell'Ateneo Lucano, Potenza, Italy

Abstract.

Stilbenic compounds recently have become the focus of a number of studies in medicine and plant physiology as well as have emerged as promising molecules that potentially affect human health. Stilbenes are relatively simple compounds synthesized by plants and deriving from the phenylalanine/polymalonate route, the last and key enzyme

of this pathway being stilbene synthase. Here, we review the biological significance of stilbenes in plants together with their biosynthesis pathway and their metabolism both by fungi and *in planta*. Special attention will be paid to the role of stilbenic molecules as phytoalexins.

© 2010 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 36, Number 5, September/October 2010, Pages 331–341 • E-mail: philippe.jeandet@univ-reims.fr

Keywords: stilbenes, stilbene synthase gene, plants, resveratrol, phytoalexins, metabolism, molecular engineering

1. Importance of stilbenes in plants

Stilbenes are natural phenolic compounds occurring in a number of plant families including Vitaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Pinaceae, Fabaceae, Poaceae, Leguminosae, and Cyperaceae. Although polyphenolics display an enormous chemical diversity, stilbenes seem to constitute a rather restricted group of molecules, the skeleton of which is based on resveratrol especially in Vitaceae and Fabaceae (Fig. 1) or pinosylvin in Pinaceae (Fig. 1). Many roles have been ascribed to stilbenes, namely, as antimicrobial, deterrent, or repellent compounds in plants, protecting them from attacks by fungi, bacteria, nematodes, or herbivores [1,2]. More recently, stilbenes (especially resveratrol and its derivatives) were acclaimed for their wondrous effects and wide range of purported healing and preventive powers as cardioprotective, antitumor, neuroprotective, and antioxidant agents [3–8]. As the later aspects will be treated elsewhere in this multiauthors review, this article will concern only some of the biological functions of stilbenes in plants together with a description of their biosynthesis pathway and

their metabolism *in planta* and by fungi. Special attention will be paid to the role of stilbenes in the interaction between grapevine and phytopathogenic microorganisms, the study of which has led to the more spectacular results and found many applications for plant disease control.

Plants in their natural environment are challenged by large numbers of potentially pathogenic microorganisms—mainly fungi, bacteria, and viruses—but also by animals. The factors determining the resistance of plants against various biotic stress factors belong to a large arsenal of constitutive and inducible (active) defense mechanisms. The typical preformed, constitutive defenses are the structural barriers (waxes, cutin, suberin, lignin, phenolics, cellulose, callose, and cell-wall proteins), which are often rapidly reinforced upon stress. Active defense mechanisms mainly involve the oxidative burst, rapid and localized cell death (hypersensitive response), accumulation of phytoalexins, and synthesis of pathogenesis-related (PR) proteins. Stilbenes intervene both in the constitutive and active defense responses of plants but the role of stilbenes as phytoalexins (see below) has been the subject of many works during the last 30 years. The role of stilbenes in the constitutive plant defenses will only be described in a few words. Briefly, the pinosylvin 3-O-methyl ether acts as a constitutive element in the resistance of pines to nematodes [9]. This compound is also a potent deterrent towards herbivores in several plant species, namely, in green alder (*Alnus crispa*) [10]. Some constitutive stilbenes from the bark of *Yucca periculosa*

*Address for correspondence: Prof. Philippe Jeandet, Research Unit "Vines and Wines of Champagne—Stress and Environment," UPRES EA 2069, Faculty of Sciences, University of Reims, P.O. Box 1039, 51687, Reims cedex 02, France. Tel.: +33326913341; Fax: +33326913340; E-mail: philippe.jeandet@univ-reims.fr
Received 10 May 2010; accepted 25 May 2010
DOI: 10.1002/biof.108
Published online 19 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)



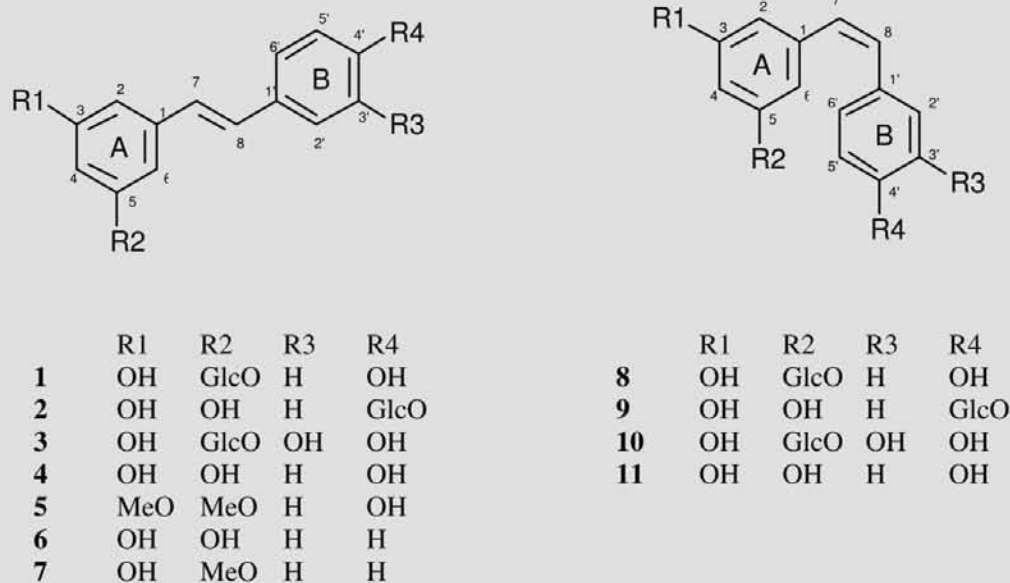


Fig. 1. Chemical structures of stilbene monomers of grapevine, peanut and pine. 1 and 8, *trans*- and *cis*-piceid; 2 and 9, *trans*- and *cis*-resveratrol; 3 and 10, *trans*- and *cis*-astringin, 4 and 11 *trans*- and *cis*-resveratrol, 5 *trans*-pterostilbene, 6 *trans*-pinosylvin, 7, *trans*-pinosylvin *O*-methylether. Glc, glucosyl (C₆H₁₁O₅).

contribute to the resistance of that plant to insect attacks [11]. The antifungal nature of stilbenes makes them to be implied as constitutive defense compounds in preventing wood decay [12]. Many grapevine genotypes may also accumulate stilbenes in nonelicited plants, playing a role in the resistance of that plant to fungal diseases [13]. Otherwise, constitutive stilbenes can act as allelochemicals; for example, piceatannol from both *Scirpus* and *Carex* spp. inhibits plant growth or plant photosynthesis, thus limiting the development of neighboring plants [14,15]. For a review of the role of stilbenes as constitutive determinants of plant defense responses or in allelochemical interactions, readers should refer to [2].

The major role ascribed to stilbenes in a number of plant families such as Fabaceae (peanut), Pinaceae (pine), and Vitaceae (grapevine) is to act as phytoalexins [16]. The concept of phytoalexins, that is, defensive substances of low molecular weight produced by plants in response to infection, was proposed in 1940 by Müller and Börger [17]. The term phytoalexin derives from Greek to mean "warding-off agents in plants" and the proposal of this elegant concept was made after deliberating two important phenomena in plant pathology. The first is the active response of the plant cell to attempted infection; the second is the acquisition of resistance by plants after exposure to microorganisms.

Stilbene phytoalexins mainly derived from resveratrol (peanut and grapevine) or pinosylvin (pine) (Fig. 1) (for a review, see [1,2]). In addition to resveratrol, other compounds considered as oligomers of resveratrol and termed viniferins have also been found in grapevine as a result of

infection or stress. The major components of these appear to be ϵ -viniferin, a cyclic resveratrol dehydrodimer, and α -viniferin, a cyclic resveratrol dehydrotrimer [1,2]. Simple stilbenes have been identified as well: *trans*-pterostilbene, a dimethylated resveratrol derivative (3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene), *trans*- and *cis*-piceid, a 3-*O*- β -D-glucoside of resveratrol, *trans*- and *cis*-astringin, a 3-*O*- β -D-glucoside of 3'-hydroxy-resveratrol, *trans*- and *cis*-resveratrol-*oside*, a 4'-*O*- β -D-glucoside of resveratrol, in grapevine; pinosylvin and its 3-*O*-methyl ether in pine and *trans*-arachidin-3 (*trans*-4-isopentadienyl-3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanut [1,2].

2. Biosynthesis of stilbenes

Stilbene phytoalexins, as flavonoid-type phytoalexins, are formed on the phenylalanine/polymalonate route, the last step of this biosynthesis pathway being catalyzed by stilbene synthase (STS) (Fig. 2). STS belongs to the so-called type III of the polyketide synthase enzyme superfamily, a class of enzymes which carry out iterative condensation reactions with malonyl-CoA. [18,19]. STS produces the simple stilbene phytoalexins in one enzymatic reaction with starter coenzyme A-esters of cinnamic acid derivatives (*p*-coumaroyl-CoA in the case of resveratrol or cinnamoyl-CoA in the case of pinosylvin) and three malonyl-CoA units. Although it was suggested that STS has a monomeric structure, the homodimeric nature of STS comprising two 40–45 kDa subunits (*M_r* ca. 90 kDa) was unambiguously demonstrated [20]. STS is closely related to chalcone synthase (CHS), the key enzyme in the formation of the flavonoid



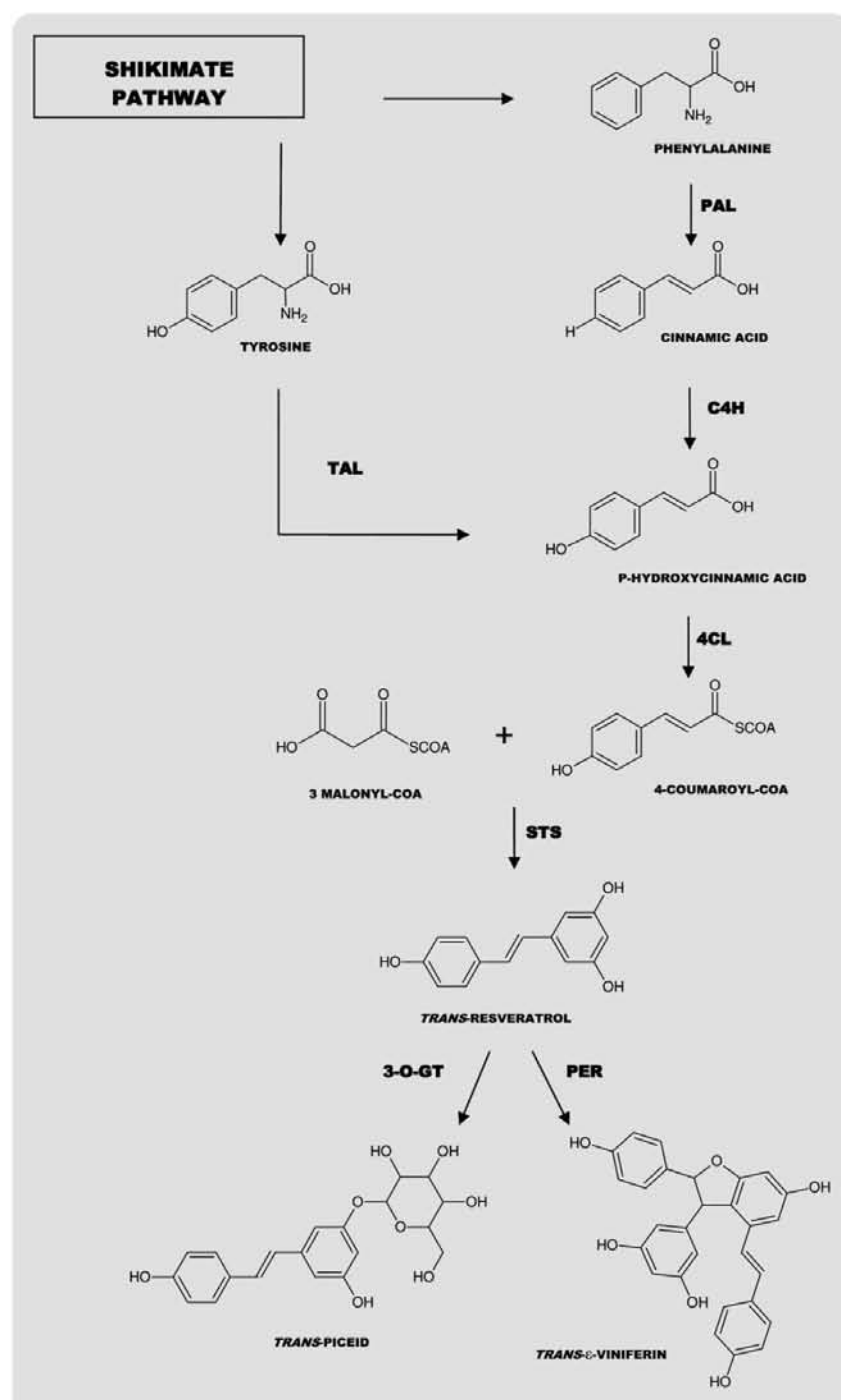


Fig. 2. Biosynthesis of resveratrol via the phenylalanine/polymalonate pathway. PAL, phenylalanine ammonia lyase; TAL, tyrosine ammonia lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; 4CL, 4-coenzyme A ligase; STS, stilbene synthase; PER, peroxidases; 3-O-GT, 3-glucosyl-O-transferase.

ring. STS and the consensus sequence of CHS from *Arachis hypogaea* share at least a 70% identity at the protein level, both sequences only differing by 35 amino acid positions

[21]. STS and CHS use the same substrates and catalyze the same condensing-type of enzyme reaction, but the ring closures are quite different, leading to two very distinctive



products, chalcone, the first C₁₅ intermediate in the C₆C₃C₆ route, and simple stilbenes, respectively. There are three sequential condensing reactions with the malonylCoA units, followed by a ring closure of a tetraketide intermediate, the condensation sequences being identical for the two enzymes up to the tetraketide stage. These condensation mechanisms have extensively been studied: in the STS-catalyzed pathway leading to stilbenes, the discovery of an aldol switch was shown to determine the type of ring-folding [22]. Finally, it has been confirmed that electronic effects rather than steric factors balance competing cyclization specificities in CHS and STS [22].

STS was first purified from cell suspension cultures of *A. hypogea* [23]. In *Vitis vinifera*, one of the plant species in which the highest amounts of resveratrol are naturally found, genome sequencing has revealed a large expansion of STS genes (43 genes identified with 20 of these previously being shown to be expressed), suggesting the great importance of stilbene metabolism for this species [24]. STS is encoded by a multigene family mainly comprising the resveratrol-forming STS genes from grapevine (*pSV21*, *pSV25*, *pSV696*, *pSV368*, and *St5y*) [25], (*Vst1*, *Vst2*, and *Vst3*) [26], and the pinosylvin-forming STS genes from pine (*PST-1*, *PST-2*, *PST-3*, *PST-4*, and *PST-5*) [27]. Three novel STS genes (*pdsts1*, *pdsts2*, and *pdsts3*) have been isolated from the roots of *Pinus densiflora* [28,29], together with a STS gene from *Vitis riparia* cv Gloire de Montpellier [30]. At present, there is only one STS gene described in a monocotyledonous plant, the *Sb STS1* gene isolated from *Sorghum* [31].

STS genes were grouped according to their responsiveness toward external signals including abiotic stresses or biotic signals originating from fungal cells [27,32]. STS cDNA and genomic clones have been described from Scots pine [33], groundnut [34], and grapevine [35,36]. Molecular analysis of cDNA and genomic clones of STS and their comparison with CHS suggests common evolutionary origin for these two enzymes [37]. Other authors confirmed the close relationship between STS and CHS by describing cross reactions of CHS and STS overexpressed in *Escherichia coli* (i.e., resveratrol formation by CHS and, reciprocally, chalcone production by STS) [38]. STS and CHS contain, at the same position, a single essential cysteine residue (Cys 164), which most likely represents the active site [39]. A single change of histidine residue (close to the active site) to glutamine is responsible for the substrate specificity in STS: in the STS that produce pinosylvin using cinnamoyl-CoA as a starter CoA ester, and resveratrol using *p*-coumaroyl-CoA, these positions are occupied by Gln-His, and His-Gln, respectively [40]. Similarly, site-directed mutagenesis demonstrated that a single arginine to histidine exchange within two STS from *Pinus strobes* accounted for the differences observed in pH optimum and enzymatic activities [41].

3. Mode of induction and regulating pathways of stilbene biosynthesis

Although a constitutive expression of STS was previously reported [36], expression of STS genes is often induced in

response to biotic and abiotic stresses (see below). Stress regulation of stilbene synthesis is especially well documented in grapevine. At a transcriptional level, it was shown that STS mRNAs accumulate in two waves, for example, 6 and 20 h after treating cell suspensions of *V. vinifera* cv Optima with cell walls of *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman [26]. Similar results were previously obtained with grapevine cell suspensions elicited with cell walls of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. [42]. These two peaks, differing in time, were thought to correspond to the expression of, at least, two different groups of STS genes: those expressed early but with a rapid degradation of the mRNAs produced and those expressed later and slowly activated, providing a more stable mRNA [26]. Zinser et al. [43] observed that ozone-induced transient STS transcript levels reached their maximal values in two subsequent waves between day 1 and day 5 after ozone exposure. Borie et al. [44] also described the occurrence of two peaks in the profile of STS mRNAs in *V. vinifera* *in vitro* grown-leaves in response to induction with UV-light, the first one reaching a maximum 8–12 h after induction, whereas the second peak occurs 22–24 h after induction. Similarly, Douillet-Breuil et al. [45] noted the occurrence of two maxima in resveratrol accumulation in grapevine leaves treated by UV-light (i.e., 20 and 40 h, respectively, after induction).

Stilbene phytoalexin synthesis is induced in plants, as for many other phytoalexins, in response to a wide range of biotic and abiotic stress factors. Formation of the phytoalexin resveratrol was first described as a response to UV-C irradiation especially in grapevine leaves and to various fungi as well (*B. cinerea* Pers.:Fr., *Plasmopara viticola* Berk. et Curtis ex. de Bary), and *Oidium tuckeri* Berk. (= *Uncinula necator* Schweinitz), and *O. tuckeri*, respectively, the causal agents for gray mold, downy mildew, and powdery mildew) [46,47] (for reviews, see [1,2]). Resveratrol and arachidin also accumulated in peanut upon infection by *Aspergillus* species [48]. Stilbenic phytoalexins are induced in a monocotyledonous plant, *Sorghum*, in response to *Colletotrichum sublineolum*, the causal agent for anthracnose [31]. Resveratrol can be synthesized by grapevine in response to other stresses: (1) induction by heavy metals such as aluminum or copper [49,50] and (2) induction by chemicals such as ozone [43,51]. A promoter deletion analysis of the resveratrol gene *Vst1* showed an ozone-responsive region different from the basal pathogen responsive sequence [51].

Some chemicals such as aluminum-containing products may also act as potent resveratrol synthesis elicitor [49,52]. Fosetyl-aluminum, for example, is a fungicide that can be associated with the priming concept, that is, it enhances the resveratrol accumulation provoked by an attack by *P. viticola*. The same indirect mode of action was also observed recently for the non-protein amino acid, β -aminobutyric acid in case of the *P. viticola*/grapevine interaction [53].

Interestingly, it has been shown that *V. vinifera* cells grown *in vitro* respond to methyljasmonate with enhancement of phytoalexin (piceid) accumulation, suggesting that jasmonate and its methylester may be key components of the signal transduction system involved in the formation of



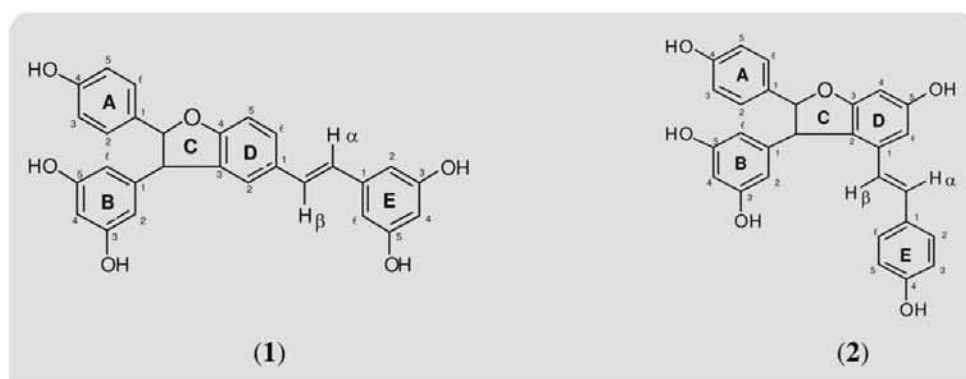


Fig. 3. Structures of δ -viniferin (1) and ϵ -viniferin (2).

grapevine phytoalexins [54]. Ethylene also triggers the upregulation of stilbene phytoalexin genes both in peanut and grapevine (as a consequence of the treatment of plants with ethephon, an ethylene-releasing product) [55,56]. Grimmig et al. [57] examining the role of ozone and ethylene in the transcriptional regulation of several genes including *Vst1* have demonstrated that ethylene is involved in the signaling ozone-induced regulation of this gene and the existence of at least two independent transduction pathways. Resveratrol synthesis steadily decreases in ripening grape berries [58] in relation to the decline in inducible *STS* gene expression [59], thus explaining the rise in susceptibility of mature fruits to *B. cinerea* infection.

The defense signaling network of grapevine cells has been extensively studied by the group of Pugin. They have elucidated using pharmacological approaches the activation mechanism of stilbene phytoalexin synthesis in grapevine cells through elicitation by an endopolygalacturonase 1 (BcPG1) from *B. cinerea*. BcPG1 is able to induce a Ca^{2+} entry from the apoplast, which triggers a phosphorylation-dependent nitric oxide (NO) production via an enzyme probably related to a NO synthase. NO is then involved in (1) cytosolic calcium homeostasis, by activating Ca^{2+} release from internal stores and regulating Ca^{2+} fluxes across the plasma membrane, (2) plasma membrane potential variation, (3) activation of reactive oxygen species (ROS) production, and (4) defense gene expression, including phenylalanine ammonia lyase and *STS* [60].

4. Metabolism of stilbenes *in planta*

Stilbenes and especially resveratrol could undergo various reactions in the plant cell such as methylation, oligomerization, and glucosylation. A stress-inducible resveratrol *O*-methyltransferase (*ROMT*) gene was recently cloned from grapevine leaves infected by downy mildew (*P. viticola*). The corresponding enzyme was able to transform resveratrol into its dimethylated derivative both *in vitro* and *in planta*. Co-expression of the *ROMT* gene together with a grapevine *STS* gene in tobacco leads to perostilbene accumulation in that plant. The *ROMT* enzyme belongs to the group of *S*-adenosyl-L-methionine-dependent *O*-methyltransferases [61]. Any-

way, a cDNA encoding a pinosylvin *O*-methyltransferase, which was isolated from a cDNA library of ozone-treated Scots pine was able to methylate the stilbene skeleton in only one position leading to pinosylvin 3-*O*-monomethyl ether [62].

Peroxidases are associated with *trans*-resveratrol oxidation to yield δ -viniferin and ϵ -viniferin (Fig. 3) [63,64]. Oxidation of 4-hydroxystilbenes (including resveratrol) is controlled by three peroxidase isoenzymes, that is, A1, B3 (located in the cell wall and cell wall-free-spaces), and B5 (located at the vacuolar level) [65]. These enzymes seem to be linked to both constitutive and inducible defenses of grapevine against fungi.

Glycosylation of polyphenolic compounds commonly occurs in plants to protect the plant cell from their potential toxic effects. At the same time, glycosylation may protect resveratrol from oxidation and enzymatic degradation and thus enhances its stability [2]. Occurrence of glycosylated resveratrol forms shows that, in early events, free resveratrol is synthesized first before being glycosylated by endogenous glucosyltransferases.

Krasnow and Murphy [66] have identified a resveratrol glucosyltransferase in cellular extracts of *V. vinifera* (cv Gamay Fréaux), this enzyme being clearly distinct from the glucosyltransferases that are active on other polyphenolic compounds. More recently, a bifunctional glucosyltransferase was able to produce either stilbene glucosides or glucose esters of hydroxycinnamic acids that was characterized from *Vitis labrusca* cv. Concord. Expression of this glucosyltransferase in the grape berry mesocarp reflects the increased accumulation of resveratrol glucosides during the maturation process [67].

Finally, the occurrence of *cis* isomers of stilbenes, namely, of piceid, suggests the existence of a stilbene isomerase *in planta* which, at present, remains to be characterized [2,68].

5. Antifungal activity

Stilbenes generally have biocidal activities against various fungal pathogens: *B. cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae* Cava [69], *P. viticola* [46,70], and



Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko & Sutton [71]. The antifungal activity of resveratrol especially has led to controversial studies and the question to know whether resveratrol is (or is not) a phytoalexin according to the definition of Müller and Börger [17] has long been debated. The first studies reporting on the biological activity of resveratrol established that ED₅₀ (i.e., effective dose or concentration required for 50% mortality) of resveratrol upon dormant conidia of *B. cinerea* or spores of *C. cucumerinum* was more than 200 µg/ml and concluded that resveratrol should be considered as a precursor of compounds of higher fungitoxicity (viniferins and pterostilbene) rather than as a phytoalexin [46].

It now appears that the resveratrol concentrations used in many studies far exceeded its solubility in water solutions. Our group [72] established that resveratrol—whose solubility was ensured by addition of a minute quantity of ethanol—has real inhibitory effects on conidial germination of *B. cinerea* liquid cultures when used at concentrations ranging from 60 µg/ml (25% inhibition) to 160 µg/ml (100% inhibition), that is, from 2.6 to 7×10^{-4} M. The ED₅₀ was 90 µg resveratrol/ml (3.9×10^{-4} M) upon conidia of *B. cinerea*. These values correspond to the activity of other phytoalexins, which are generally active at concentrations of 10^{-4} to 10^{-5} M. Pterostilbene is fivefold more active than resveratrol: this stilbene completely inhibiting conidial germination at concentrations ranging from 52 to 60 µg/ml (ED₅₀ = 18–20 µg/ml, that is, 7 to 7.8×10^{-5} M) [72]. The differences among the biocidal activity of two related stilbene compounds indicate that the *in vivo* methylation of hydroxyphenyl groups can potentially lead to increased biocidal activity in phenolics. ε-viniferin was reported to show a higher antifungal activity upon germination of *B. cinerea* conidia (ED₅₀ = 7.9×10^{-5} M) than resveratrol.

Stilbenes may also alter fungal morphogenesis. Treatment of conidia with sub-lethal or lethal concentrations of resveratrol or pterostilbene does indeed result in cytological abnormalities in *B. cinerea* conidia, including the formation of curved germ tubes, cessation of growth of some germ tubes with protoplasmic retraction in the dead hyphal tip cell, cytoplasmic granulation of conidia, disruption of the plasma membrane, regrowth of a secondary or tertiary germ tube from the surviving conidium. Some of these features have previously been described for other phytoalexin/pathogen interactions (see [72] and references therein). For example, the asymmetric growth of conidium germ tubes may be the result of the ability of stilbenes, namely, resveratrol, to interact with tubulins, with resultant disruption of microtubule assembly at this level, as described by Woods et al. [73] working with various stilbenes based on combretastatin A-4 and used in cancer therapy. This mode of action is typical for many fungicides, such as benomyl, a fungicide used for the control of gray mold in the vineyard [74].

At an ultrastructural level, Pezet and Pont [75] reported that methylated stilbenes added to dormant conidia of *B. cinerea* induce strong modifications of the endocellular membrane system; specifically, they cause the rapid destruction of endoplasmic reticulum, and of nuclear and mitochondrial membranes, all these phenomena synchronously

appearing with a complete cessation of respiration. Within 30 min, the cytoplasm is coagulated into numerous vacuoles and mitochondria are clear with a complete disorganization of the cristae. Destruction of the conidium ends (after 3 h) with the disruption of the plasma membrane.

Studies on the mode of action of hydroxystilbenes on fungal cells suggested that 4'-hydroxystilbenes (especially those presenting methoxy-groups or electron-attracting substituents such as chlorine at the 3-, 3,4-, or 3,5-positions of the stilbene ring) play an important role in the formation of charge transfer complexes, favoring contact and affinity with (membrane) proteins and acting as uncoupling agents of electron transport and photophosphorylation [75,76]. Interestingly, the importance of the 4'-hydroxyphenyl group in the stilbenic structure was also confirmed by experimental studies concerning its requirement for cell proliferation inhibition [77], its genotoxic activity [78] as well as its efficacy for free radicals scavenge [79].

6. Fungal metabolism of stilbenes and role of ABC transporters in fungal pathogenicity

Simple stilbenes undergo oxidative dimerization during their metabolism by *B. cinerea*, the causal microorganism for gray mold, this process generally involving the hydroxyphenyl group situated at the 4'-position of the stilbene skeleton [80–82]. This reaction is catalyzed by a laccase-like stilbene oxidase (STOx) which presents two major isoforms with pI 4.35 and 4.3 and a molecular mass of 32 kDa [83]. Studies carried out first by our group have shown that resveratrol metabolism by STOx of *B. cinerea* includes an oxidative dimerization process (involving the 4'-hydroxyphenyl group of one stilbene unit) leading to a resveratrol dehydrodimer slightly different from ε-viniferin and called δ-viniferin (Fig. 3) [80,82]. These results were further confirmed by Cichewicz et al. [84], who showed that, in addition to the dehydrodimer, resveratrol fungal metabolism can lead to other oxidized resveratrol dimers, such as restrytisols (A–C), leachinol F, and pallidol.

Dimerization of stilbene monomers may include as an intermediate compound a quinone that leads to a radical with a substituted *p*-hydroxyphenyl group, thus explaining chemical reactivity of stilbene phytoalexins. Still at question is, whether the degradation of stilbene monomers by laccase of *B. cinerea* corresponds to a detoxification process and which role the oxidative degradation of grapevine phytoalexins plays in the *B. cinerea*–grapevine interaction. In the case of resveratrol or pterostilbene, dimerization by a laccase-like stilbene-oxidase of *B. cinerea* results in stilbenes of high molecular weights (twice that of the monomeric form), which are barely soluble in water, preventing evaluation of their biological activity. Thus, fungal metabolism of phytoalexins may result in insoluble products allowing fungi to escape from the action of grapevine phytoalexins [82].



Fungal transporters may extrude plant defense products, as well as fungicides, and thereby play an important role in pathogenicity [85–87]. Recent studies have shown that ATP-binding cassette (ABC) transporters might provide protection against plant defense compounds and fungicides by ATP-driven efflux mechanisms. Two ABC transporter genes, *BcatrA* and *BcatrB* have been detected and characterized in *B. cinerea* [87,88]. Disruptant mutants for the gene *BcatrB* of *B. cinerea*—but not for the *BcatrA* gene—were reported to display increased sensitivity to resveratrol and the phenylpyrrole fungicides and to show slightly reduced virulence on grapevine leaves [89]. In *Aspergillus nidulans*, the transcription of the ABC transporter gene *atrB* is induced by resveratrol [90]. *MgAtr* (ABC transporter gene) deletion mutants of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt, showed an increase in the sensitivity to resveratrol, suggesting a role for this transporter in protecting the fungus against plant defense compounds [91]. Resveratrol also induces specifically the transcription of an ABC transporter gene, *PMR5*. This gene has a role in multidrug resistance and has been cloned from the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* [92]. To elucidate the function of *PMR5*, investigations on the susceptibility of the *Dpmr5* mutant to resveratrol and other antifungal agents have been conducted. An increased sensitivity of the mutants has been demonstrated. It appears clearly evident that, in phytopathogenic fungi, ABC transporters act as virulence factors, providing protection against defense compounds produced by the host. In several plant–fungus interactions, it has become evident that the ability to weaken or neutralize the effects of phytoalexins is one of the essential determinants of fungal host range.

7. Molecular engineering of stilbenes in plants

Traditional breeding to develop plants with a higher degree of tolerance or resistance against pathogens is an extremely slow process. As an alternative, a strategy of genetic engineering offers the possibility of introducing new characteristics into existing commercial cultivars. STS is a key enzyme of resveratrol synthesis, using as substrates precursor molecules that are present throughout the plant kingdom. Therefore, the introduction of a single gene is sufficient to synthesize resveratrol in heterologous plant species. Transformations were then operated to investigate the potential of stilbene biosynthetic genes to confer resistance to pathogens (for recent reviews, see [93,94]). The first gene transfer experiments were performed with one complete STS gene from *A. hypogea* introduced into *Nicotiana tabacum* [95] where its expression resulted in resveratrol synthesis after induction with short-wavelength UV-light, which is a well-known elicitor of resveratrol synthesis [96]. Moreover, it was shown that the transfer of two grapevine STS genes (*Vst1* and *Vst2*) into tobacco confers a higher resistance to *B. cinerea* infection [95]. This study constitutes the first report of a disease resistance resulting from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Similarly, Hipskind and Paiva

[97] have transformed alfalfa (*Medicago sativa*) with a peanut cDNA encoding resveratrol synthase transcriptionally regulated by an enhanced cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. The transgenic plants so obtained accumulated *trans*-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside (piceid) and showed an increased resistance to *Phoma medicaginis*. The grapevine rootstock 41-B overexpressing STS produces high stilbene levels and exhibit a reduction of the symptoms in response to an infection by *B. cinerea* [98]. Similar transformations have improved the resistance of rice to *P. oryzae* [99], tomato to *Phytophthora infestans* [100], barley and wheat to *B. cinerea* [101,102], wheat to *O. tuckeri* [101,102], alfalfa to *P. medicaginis* [97], and papaya to *Phytophthora palmivora* [103].

All these results show that resveratrol is a determinant factor in the expression of resistance of plants to phytopathogens and correspond to the definition of phytoalexins given by Müller and Börger [17]. However, there are some cases for which no resistance was observed after transforming the plants with STS genes. For example, transformation of white poplar (*Populus alba*) with a cDNA insert coding STS that leads to the biosynthesis of both *cis* and *trans* isomers of piceid does not confer any increased resistance to *Melospira pulcherrima* (rust disease) [104]. Similarly, no increased resistance against *B. cinerea* has been observed in STS transgenic kiwi plants [105]. These contradictory results show that pathogen control by transgenic STS plants can be significant but can be considered as empiric and unpredictable. In tobacco and petunia, overexpression of a transgenic STS gene leads to substrate competition between STS and CHS and causes male sterility [106]. It is thus preferable to transform plants with a construct having a pathogen-inducible promoter. *Vst1* and *StSy* genes are the most commonly used to transform different species [94]. Other STS-coding genes have also been chosen to transform plants, like the *AhRS* gene from *A. hypogea* [97], the *SbSTS1* gene from *Sorghum bicolor* [31] or a STS-coding gene from *Parthenocissus henryana*, a species of the Vitaceae [107]. To increase the level of stilbene production, some studies have used chimeric genes or a combination of two STS-coding genes, based onto *Vst1* and *Vst2* genes [102,106]. *Vst1* gene expression rate was shown to be sixfold higher than that of *Vst2* in wheat [108]. The same situation was also observed in *Vitis* spp. where transcript amounts of *Vst2* are 10- to 100-fold higher than those of *Vst1* [26]. However, *Vst2* transcripts accumulated significantly later than those of *Vst1* and remained stable over a longer period of time [108]. In most cases, expression of these STS-coding genes leads to stilbene accumulation and/or pathogen resistance, indicating that such transgenes are functional in foreign species [94].

8. Are stilbenes good markers of the resistance of plants to biotrophic pathogens?

Phytoalexins have long been recognized to as being important in the defense mechanisms of plants against



phytopathogenic microorganisms. Their potential biological properties have stimulated a ferment of activity concerning the biosynthesis and the metabolism of these compounds in the plant. Research has gone forward because these compounds are thought to help agriculturally and economically important crop plants withstand colonization by pathogens. In many instances, a close correlation has been found between phytoalexin production and resistance to diseases. And what of stilbene phytoalexins?

There is a positive correlation between the production of resveratrol and its derivatives and the resistance of *Vitis* spp. to biotrophic pathogens such as *P. viticola* and *B. cinerea*. The pioneering work of Pool et al. [109] underlined the importance of both the speed and the intensity of resveratrol production in such correlations. More recently, it has been shown that not only the amounts of stilbenes synthesized but also the type of compounds that are produced can intervene in the resistance of grapevine to microorganisms. Grapevine cultivars susceptible to the biotrophic pathogen, *P. viticola*, are able to produce high amounts of resveratrol that are rapidly converted into the less toxic glucoside. In contrast, resistant genotypes were able to synthesize high amounts of resveratrol, which were rapidly dimerized into the more toxic viniferins [110]. Similar results were obtained in grapevine varieties infected with powdery mildew but in this case, it was observed that higher amounts of the most antifungal viniferins were produced at infection sites within resistant cultivars than in the susceptible ones [111]. Resistance of grapevine to *P. viticola* has been correlated with the ability of grapevine to accumulate resveratrol but also ϵ -viniferin (see above) following UV-C irradiation [112]. Based on the analysis of 95 different genotypes, Stein and Hoos [113] established a close positive correlation between stilbene production potential and resistance to *B. cinerea*. Their results were further confirmed by our group studying the resveratrol production in *in vitro*-grown plantlets from 13 different species and cultivars [114]. The good correlation obtained between stilbene production and resistance of grapevine to *B. cinerea* led these authors to propose resveratrol assessment as a tool for the selection of grapevine varieties resistant to phytopathogenic microorganisms. More recently, a high-stilbene content, namely, in resveratrol and arachidin, was correlated to the insect resistance of various peanut genotypes [115].

9. Conclusions

Considering the numerous biological activities of stilbenes and their current uses for pharmacological and cosmetic applications, research activities have now centered upon molecular engineering of stilbenes in plants with the objective of increasing their tolerance to pathogenic microorganisms and improving the nutritional quality of food products through the expression of pharmaceutically active compounds in plants incapable of synthesizing resveratrol [93,94]. Some optimistic data have been obtained in this area, showing that disease resistance does indeed result

from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Beside, increased demand for stilbenic molecules for nutraceutical, cosmetic, and possibly pharmaceutical uses, makes their production from sustainable sourcing a necessity. In this context, the use of biotechnology through recombinant microorganisms and plant cell suspensions is particularly promising [116].

References

- [1] Jeandet, P., Douillet, A. C., Debord, S., Sbaghi, M., Bessis, R., and Adrian, M. (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2731–2741.
- [2] Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **117**, 143–155.
- [3] Anekonda, T. S. (2006) Resveratrol—a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* **52**, 316–326.
- [4] Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., and Kim, A. L. (2007) Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **224**, 274–283.
- [5] Baur, J. A. and Sinclair, D. A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 493–506.
- [6] King, R. E., Bomser, J. A., and Min, D. B. (2006) Bioactivity of resveratrol. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**, 65–70.
- [7] Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., and Szekeres, T. (2008) Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.* **658**, 68–94.
- [8] Jeandet, P., Paradiso, F., Cocina, R. A., Bolettieri, D., Delaunois, B., Conreux, A., Cordelier, S., and Clément, C. (2009) Resveratrol in health and disease—plant engineering with the stilbene synthase gene. *Cerevisia* **34**, 238–242.
- [9] Soga, T., Otha, S., Munesada, K., Ide, N., Kurokawa, M., Shimizu, M., and Otha, E. (1993) Endogenous pine wood and nematocidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobes* and *P. palustris*. *Phytochemistry* **33**, 1395–1401.
- [10] Bryant, J. P., Gregory, D. W., Reichardt, P. B., Lewis, V. E., and McCarthy, M. C. (1983) Pinosylvin methyl ether deters snowshoe hare feeding on green alder. *Science* **222**, 1023–1025.
- [11] Torres, P., Avila, J. G., Romo de Vivar, A., Garcia, A. M., Martin, J. C., Aranda, E., and Cespedes, C. L. (2003) Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry* **64**, 463–473.
- [12] Hart, J. H. (1981) Role of phytoalexins in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19**, 437–458.
- [13] Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., and Velasco, R. (2008) Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11773–11785.
- [14] Seigler, D. S. (2006) Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. In *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* (Reigosa Roger, M. J., Reigosa, M. J., Pedrol, N., and Gonzalez, L., eds.), pp. 11–58, Springer, New York, Heidelberg.
- [15] Fiorentino, A., d'Abrosca, B., Pacifico, S., Izzo, A., Letizia, M., Esposito, A., and Monaco, P. (2008) Potential allelopathic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. *Biochem. Syst. Ecol.* **36**, 691–698.
- [16] Langcake, P. and Pryce, R. J. (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 151–152.
- [17] Müller, K.O. and Börger, H. (1940) Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora* Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst.* **23**, 189–231.
- [18] Austin, M. B. and Noel, J. P. (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79–110.
- [19] Yu, O. and Jez, M. (2008) Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant J.* **54**, 750–762.
- [20] Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., and Schröder, J. (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and



- chalcone synthase): a single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. *J. Biol. Chem.* **270**, 7922–7928.
- [21] Schröder, G., Brown, J. W. S., and Schröder, J. (1988) Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA: genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.* **197**, 161–169.
 - [22] Austin, M. B., Bowman, M. E., Ferrer, J. L., Schröder, J., and Noel, J. P. (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem. Biol.* **11**, 1179–1194.
 - [23] Schoeppner, A. and Kindl, H. (1984) Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension of peanut. *J. Biol. Chem.* **259**, 6806–6811.
 - [24] Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Ségurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gasparo, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Leacou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Blondon, A. F., Weissenbach, J., Quétier, F., and Wincker, P. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463–467.
 - [25] Melchior, F. and Kindl, H. (1991) Coordinate and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia lyase genes in *Vitis* cv Optima. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 552–557.
 - [26] Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., and Kindl, H. (1994) Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol. Biol.* **26**, 667–677.
 - [27] Preisig-Müller, R., Schwekendiek, A., Brehm, I., Reif, H. J., and Kindl, H. (1999) Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant Mol. Biol.* **39**, 221–229.
 - [28] Kodan, A., Kuroda, H., and Sakai, F. (2001) Simultaneous expression of stilbene synthase genes in Japanese red pine (*Pinus densiflora*). *J. Wood Sci.* **47**, 58–62.
 - [29] Kodan, A., Kuroda, H., and Sakai, F. (2002) A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3335–3339.
 - [30] Goodwin, P. H., Hsiang, T., and Erickson, L. (2000) A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier. *Plant Sci.* **151**, 1–8.
 - [31] Yu, C. K. Y., Springob, K., Schmidt, J., Nicholson, R. L., Chu, I. K., Yip, W. K., and Lo, C. (2005) A stilbene synthase gene (*SbSTS1*) is involved in host and non host defense responses in *Sorghum*. *Plant Physiol.* **138**, 393–401.
 - [32] Brehm, I., Preisig-Müller, R., and Kindl, H. (1999) Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase genes containing cGMP-responsive promoter elements. *Z. Naturforsch. (C)* **54**, 220–229.
 - [33] Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, G. S., Britsch, L., and Schröder, J. (1992) Molecular analysis of chalcone and dihydrosinyl synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* **18**, 489–503.
 - [34] Lanz, T., Schröder, G., and Schröder, J. (1990) Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea*. *Planta* **181**, 169–175.
 - [35] Melchior, F. and Kindl, H. (1990) Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS Lett.* **268**, 17–20.
 - [36] Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzio, G., and Tonelli, C. (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* **24**, 743–755.
 - [37] Tropf, S., Kärcher, B., Schröder, G., and Schröder, J. (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthases). *J. Biol. Chem.* **270**, 7922–7928.
 - [38] Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Suh, D. Y., Sankawa, U., Nishioka, M., Shibuya, M., and Ebizuka, Y. (1999) Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **460**, 457–461.
 - [39] Suh, D. Y., Kagami, J., Fukuma, K., and Sankawa, U. (2000) Evidence for catalytic cysteine-histidine dyad in chalcone synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 725–730.
 - [40] Schröder, J. and Schröder, G. (1992) A single change of histidine to glutamine alters the substrate preferences of a stilbene synthase. *J. Biol. Chem.* **267**, 20658–20660.
 - [41] Raiber, S., Schröder, G., and Schröder, J. (1995) Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern pine (*Pinus strobus*). A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes. *FEBS Lett.* **361**, 299–302.
 - [42] Liswidawati, F., Melchior, F., Hohmann, F., Schwer, B., and Kindl, H. (1991) Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* **183**, 307–314.
 - [43] Zinser, C., Jungblut, T., Heller, W., Seidlitz, H. K., Schnitzler, J. P., Ernst, D., and Sandermann, H. (2000) The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Environ.* **23**, 975–982.
 - [44] Borie, B., Jeandet, P., Bessis, R., and Adrian, M. (2004) Comparison of resveratrol and stilbene synthase mRNA production from grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 60–64.
 - [45] Douillet-Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M., and Bessis, R. (1999) Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4456–4461.
 - [46] Langcake, P. (1981) Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 213–226.
 - [47] Bavaresco, L. and Eibach, R. (1987) Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tuckeri*), downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis* **26**, 192–200.
 - [48] Sobolev, V. S. (2008) Localized production of phytoalexins by peanut (*Arachis hypogaea*) kernels in response to invasion by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1949–1954.
 - [49] Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., and Joubert, J. M. (2008) Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1979–1981.
 - [50] Aziz, A., Trodel-Aziz, P., Dhucq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., and Vernet, G. (2006) Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to fungal pathogens. *Phytopathology* **96**, 1188–1194.
 - [51] Schubert, R., Fischer, R., Hain, R., Schreier, P. H., Bahnweg, G., Ernst, D., and Sandermann, H. (1997) An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol. Biol.* **34**, 417–426.
 - [52] Dercks, W. and Creasy, L. L. (1989) Influence of fosetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 203–213.
 - [53] Slaughter, A. R., Hamiduzzaman, M. M., Gindro, K., Neuhaus, J. M., and Mauch-Mani, B. (2008) Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur. J. Plant Pathol.* **122**, 185–195.
 - [54] Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., and Méillon, J. M. (2008) Effect of methyljasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 493–499.
 - [55] Chung, L. M., Park, M. R., Rehman, S., and Yun, S. J. (2001) Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Mol. Cells* **12**, 353–359.



- [56] Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Coriot-Costet, M. F., and Mérillon, J. M. (2008) Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5781–5787.
- [57] Grimmig, B., Gonzalez-Perez, M. N., Leubner-Metzger, G., Vogeli-Lange, R., Meins, F., Hain, R., Penuelas, J., Heidenreich, B., Langebartels, C., Ernst, D., and Sandermann, H. (2003) Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signalling. *Plant Mol. Biol.* **51**, 599–607.
- [58] Jeandet, P., Bessis, R., and Gautheron, B. (1991) The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 41–46.
- [59] Bais, A. J., Murphy, P. J., and Dry, I. B. (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**, 425–433.
- [60] Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M., and Pugin, A. (2006) Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 429–440.
- [61] Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., and Hugueney, P. (2008) A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* **148**, 1630–1639.
- [62] Chiron, H., Drouet, A., Claudot, A. C., Eckerskorn, C., Trost, M., Heller, W., Ernst, D., and Sandermann, H. (2000) Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Mol. Biol.* **44**, 733–745.
- [63] Stoessl, A. (1982) Biosynthesis of phytoalexins. In *Phytoalexins* (Bailey, J. A. and Mansfield, J. W., eds.), pp. 133–180, Blackie, Glasgow, London.
- [64] Sako, M., Hosokawa, H., Ito, T., and Iinuma, M. (2004) Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and ϵ -viniferin (*E*)-dehydrodimers. *J. Org. Chem.* **69**, 2598–2600.
- [65] Ros-Barcelo, A., Pomar, F., Lopez-Serrano, M., and Pedreno, M. A. (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Funct. Plant Biol.* **30**, 577–591.
- [66] Krasnow, M. N. and Murphy, T. M. (2004) Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3467–3472.
- [67] Hall, D. and De Luca, V. (2007) Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *Plant J.* **49**, 579–591.
- [68] Jeandet, P., Breuil, A. C., Adrian, M., Weston, L. A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G., and Bessis, R. (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.* **69**, 5172–5177.
- [69] Langcake, P. and Pryce, R. J. (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **9**, 77–86.
- [70] Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H. (2004) Effect of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43**, 145–148.
- [71] Celimene, C. C., Smith, D. R., Young, R. A., and Stanosz, G. R. (2001) *In vitro* inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry* **56**, 161–165.
- [72] Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A., and Bessis, R. (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1689–1702.
- [73] Woods, J. A., Hafield, J. A., Pettit, G. R., Fox, B. W., and McGown, A. T. (1995) The interaction with tubulin of a series of stilbenes based on combretastatin A-4. *Br. J. Cancer* **71**, 705–711.
- [74] Hoang-Van, K., Rossier, C., Baija, F., and Turian, G. (1989) Characterization of tubulin isotypes and of β -tubulin mRNA of *Neurospora crassa* and effects of benomyl on their developmental time courses. *Eur. J. Cell Biol.* **49**, 42–47.
- [75] Pezet, R. and Pont, V. (1990) Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *J. Phytopathol.* **129**, 29–30.
- [76] Pont, V. and Pezet, R. (1990) Relation between the chemical structure and biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* **130**, 1–8.
- [77] Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U. M., Albini, A., Prosperi, E., and Vannini, V. (2001) Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem.* **276**, 22586–22594.
- [78] Matsuoka, A., Takeshita, K., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K., and Miyata, N. (2002) The 4'-hydroxy group is responsible for the *in vitro* cytogenetic activity of resveratrol. *Mutat. Res.* **521**, 29–35.
- [79] Brede, O., Stojanovic, S., and Sprinz, H. (2002) Antioxidant action of transresveratrol and its analogues in the radiation-induced liposome oxidation. *Free Radic. Res.* **36**, 76–77.
- [80] Breuil, A. C., Adrian, M., Piro, N., Meunier, P., Bessis, R., and Jeandet, P. (1998) Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: characterization of a resveratrol dehydromer. *Tetrahedron Lett.* **39**, 537–540.
- [81] Adrian, M., Rajei, H., Jeandet, P., Veneau, J., and Bessis, R. (1998) Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* **88**, 472–476.
- [82] Breuil, A. C., Jeandet, P., Chopin, F., Adrian, M., Piro, N., Meunier, P., and Bessis, R. (1999) Characterization of a pterostilbene dehydromer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89**, 298–302.
- [83] Pezet, R. (1998) Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.: *FEBS Microbiol. Lett.* **167**, 203–208.
- [84] Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A., and Hamann, M. T. (2001) Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* **63**, 29–33.
- [85] Urban, M., Bhargava, T., and Hamer, J. E. (1999) An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**, 512–521.
- [86] Del Sorbo, G., Schoonbeek, H., and De Waard, W. A. (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* **30**, 1–15.
- [87] Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, W. A. (2001) The ABC transporter *BcatrB* affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 562–571.
- [88] Del Sorbo, G., Ruocco, M., Schoonbeek, H. J., Scala, F., Pane, C., Vinale, F., and De Waard, M. A. (2008) Cloning and functional characterization of *BcatrA*, a gene encoding an ABC transporter of the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol. Res.* **112**, 737–746.
- [89] Vermeulen, T., Schoonbeek, H., and De Waard, W. A. (2001) The ABC transporter *BcatrB* from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Manag. Sci.* **57**, 393–402.
- [90] Del Sorbo, G., Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G., Van Kan, J. A., Balzi, E., and De Waard, W. A. (1997) Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 417–426.
- [91] Zwiers, L. H. and De Waard, W. A. (2000) Characterization of the ABC transporter genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* **30**, 115–125.
- [92] Nakaune, R., Hamamoto, H., Imada, J., Akutsu, K., and Hibi, T. A. (2002) A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 179–185.
- [93] Hall, C. and Yu, O. (2008) Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends Biotechnol.* **26**, 77–81.
- [94] Delaunoy, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clément, C., and Jeandet, P. (2009) Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 2–12.



- [95] Hain, R., Reif, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P., Stöcker, R., and Stenzel, K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153–156.
- [96] Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Tesson, L., and Bessis, R. (2000) Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6103–6105.
- [97] Hipskind, J. D. and Paiva, N. L. (2000) Constitutive accumulation of a resveratrol glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 551–562.
- [98] Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., and Boulay, M. (2001) *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J. Exp. Bot.* **52**, 901–910.
- [99] Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänbler, G., Mühlbach, H. P., and Thomzik, J. E. (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* **16**, 668–673.
- [100] Thomzik, J. E., Stenzel, K., Stöcker, R., Schreier, P. H., Hain, R., and Stahl, D. J. (1997) Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **51**, 265–278.
- [101] Leckband, G. and Lörz, H. (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 1004–1012.
- [102] Fettig, S. and Hess, D. (1999) Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines. *Transgenic Res.* **8**, 179–189.
- [103] Zhu, Y. J., Agbayani, R., Jazckson, M. C., Tang, C. S., and Moore, P. H. (2004) Expression of the grapevine stilbene synthase gene *Vst1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* **12**, 807–812.
- [104] Giorcelli, A., Sparvoli, F., Mattivi, F., Tava, A., Balestrazzi, A., Vrhovsek, U., Calligari, P., Bollini, R., and Confalonieri, M. (2004) Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transgenic Res.* **13**, 203–214.
- [105] Kobayashi, S., Ding, C. K., Nakamura, Y., Nakajima, I., and Matsumoto, R. (2000) Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Rep.* **19**, 904–910.
- [106] Fischer, R., Budde, I., and Hain, R. (1997) Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *Plant J.* **11**, 489–498.
- [107] Liu, S., Hu, Y., Wang, X., Zhong, J., and Lin, Z. (2006) High content of resveratrol in lettuce transformed with a stilbene synthase gene from *Parthenocissus henryana*. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8082–8085.
- [108] Serazetdinova, L., Oldach, K., and Lörz, H. (2005) Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *J. Plant Physiol.* **162**, 985–1002.
- [109] Pool, R. M., Creasy, L. L., and Frackelton, A. S. (1981) Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis* **20**, 136–145.
- [110] Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J. L. (2004) Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65**, 297–303.
- [111] Schnee, S., Viret, O., and Gindro, K. (2008) Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **72**, 128–133.
- [112] Dercks, W. and Creasy, L. L. (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 189–202.
- [113] Stein, U. and Hoos, G. (1984) Induktions und Nachweismethoden für Stilbene bei Vitaceen. *Vitis* **23**, 179–194.
- [114] Sbaghi, M., Jeandet, P., Faivre, B., Bessis, R., and Fournioux, J. C. (1995) Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* **86**, 41–47.
- [115] Sobolev, V. S., Guo, B. Z., Holbrook, C. C., and Lynch, R. E. (2007) Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2195–2200.
- [116] Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., and Courot, E. (2009) Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol.* **27**, 706–713.

